

Aus der Hals-, Nasen-, Ohren-Klinik und Poliklinik – Plastische Operationen  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Komplementaktivität in Oropharynxtumoren unterscheidet sich abhängig vom  
HPV-Status

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Teri Kim  
aus Seoul

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 27. Mai 2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung und Hypothese</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion</b> .....	<b>3</b>
2.1 Das plattenepitheliale Oropharynxkarzinom.....	3
2.1.1 Inzidenz .....	3
2.1.2 Anatomie .....	3
2.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren .....	3
2.1.4 Klinik und Histologie .....	4
2.1.5 Diagnostik und Staging .....	5
2.1.6 Therapie und Prognose.....	7
2.2 Das humane Papillomvirus.....	9
2.2.1 Charakterisierung des HPV .....	9
2.2.2 Abwehrmechanismen des Wirts und Evasionsmechanismen des HPV .....	9
2.2.3 Diagnostik des HP-Virus.....	10
2.2.4 Das p16-Protein.....	11
2.3 Die lymphogene Metastasierung .....	12
2.3.1 Das lymphatische System.....	12
2.3.2 Die Lymphknotenmetastasierung.....	13
2.3.3 unerwünschte Nebenwirkungen der Lymphknotendisektion.....	14
2.4 Das Immunsystem: Das Komplementsystem.....	15
2.4.1 Die Funktion und Aktivierung des Komplementsystems.....	15
2.4.2 Das physiologische Äquilibrium der Komplementaktivierung .....	16
2.4.3 Der MAC-Komplex im Bezug zum Tumor .....	17
2.4.4 Das C5a in Bezug zum Tumor .....	17
2.4.5 Komplementregulatorproteine: Faktor H und das CD59 .....	19
2.5 Tumor Microenvironment .....	23
2.5.1 Lymphozyten.....	23
2.5.2 Myeloische Zellen .....	24

2.5.3	Stromazellen.....	25
2.6	Immuntherapie .....	27
2.6.1	Monoklonale Antikörper.....	27
2.6.2	Onkolytische Viren .....	29
2.6.3	Immunzell-basierte Therapie (Adoptiver Zelltransfer) .....	30
2.6.4	Therapeutische Impfung.....	30
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.1	Patientenkollektiv.....	32
3.2	Herstellung der TMAs.....	33
3.3	Immunhistochemische Färbung der TMAs.....	34
3.4	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen .....	38
3.5	Statistische Auswertung .....	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
4.1	Charakterisierung des Kollektivs .....	42
4.1.1	Tumor.....	42
4.1.2	Lymphknoten .....	46
4.2	Charakterisierung der immunhistochemischen Färbung .....	49
4.3	P16-positive Tumore weisen mehr Immunzellen und weniger Faktor H auf.....	52
4.4	Der Tabakkonsum verändert die Tumormikroumgebung im Primärtumor.....	55
4.5	Immunzellinfiltrat, der Komplementinhibitor Faktor H und die Komplementaktivität beeinflussen das Risiko einer Lymphknotenmetastasierung .....	57
4.6	Das Survival in Abhängigkeit von C5a, Faktor H und der Immunzellzahl.....	61
4.7	Der Tabakkonsum beeinflusst neben dem Primärtumor auch die Lymphknotenmetastase..	64
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
5.1	Einfluss des N-Stadiums auf das Survival bei HPV-negativen Tumoren und HPV-positiven Tumoren.....	69
5.2	Immunzellzahl und FH-H-Score variiert abhängig vom HPV-Status .....	70
5.3	Immunzellzahl und FH-H-Score variiert abhängig vom Tabakkonsum .....	74
5.4	Bei N > 0 Tumoren verändern sich die Konzentrationen von Komponenten des Immunsystems abhängig vom HPV-Status.....	75

5.5	C5a und das Survival.....	78
5.6	Limitationen durch die Versuchsdurchführung.....	79
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf des Autors.....</b>	<b>88</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity, Antikörper-abhängige zellvermittelte Toxizität
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Basic fibroblast growth factor, basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
CAF	Cancer-associated fibroblasts, Tumor-assoziierte Fibroblasten
CAR-T-Zell-Therapie	auf chimären Antigenrezeptoren basierende T-Zell-Therapie
Caspase	Cystein-Aspartat-Proteasen
CCP	Komplementregulatorproteine
ccRCC	Clear cell renal cell carcinoma, klarzelliges Nierenzellkarzinom
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement-dependent cytotoxicity/ Komplement-abhängige Zytotoxizität
CDCC	Complement-mediated cellular cytotoxicity, Komplementabhängige zellvermittelte Toxizität
CIN III	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
C5aR	C5a-Rezeptor
DAMP	Damage-associated molecular pattern, Schaden-assoziierte molekulare Muster
EGFR	Epidermal growth factor receptor, Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FDA	Food and drug administration
FH	Faktor H
FHL-1	Factor H-like protein 1, FH-ähnliches Protein 1
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma, Kopf-Hals-Karzinom
HPV	Humanes Papillomvirus

## Abkürzungsverzeichnis

IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IG	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ISH	In-situ Hybridisierung
LNR	Lymph node ratio
MAC	Membranangriffskomplex
MDSCs	Myeloid-derived suppressor cells, myeloische Suppressorzellen
MHC	Major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSCLC-Karzinom	Non-small-cell lung cancer/ nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom/ Lungenkarzinom
OPSCC	Oropharynxkarzinom
OS	Overall Survival, Gesamtüberleben
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
PD-1/ PD-L1	Programmed death receptor 1/ ligand 1
PDGF	Platelet derived growth factor, Plättchen-Wachstumsfaktor
PTX <sub>3</sub>	Pentraxin 3
Py	Packungsjahr
RKI	Robert Koch Institut
RNS	Reactive nitrogen species, reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reactive oxygen species, reaktive Oxygenspezies
sCC	Squamous cell carcinoma, Plattenepithelkarzinom
scFvs	Single-Chain fragment variable
SCR	Short consensus repeat
STAT	Signaltransduktoren und -aktivatoren
STING	Stimulator of interferon genes
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen

## Abkürzungsverzeichnis

TAN	Tumor-assoziierte neutrophile Granulozyten
TCR-T-Therapie	T-Zell-Rezeptor-Therapie
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TECs	Tumor endothelial cells
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TIL-Therapie	Therapie mit Tumor-infiltrierenden Lymphozyten
TMA	Tissue Microarray
TME	Tumor microenvironment, Tumormikroumgebung
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	Regulatorische T-Zellen
VEGF	Vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1. Immunhistochemische Färbung der TMAs.....</b>	<b>37</b>
<b>Abbildung 2. Färbungsanalyse mit QuPath-0.2.0. ....</b>	<b>39</b>
<b>Abbildung 3. Färbungsanalyse mit QuPath-0.2.0. ....</b>	<b>40</b>
<b>Abbildung 4. Verteilung des TNM-Stadiums (A–C) bei Primärtumoren.....</b>	<b>43</b>
<b>Abbildung 5. Kaplan-Meier-Analyse zur Darstellung des OS in Abhängigkeit vom HPV-Status des Gesamtkollektivs .....</b>	<b>43</b>
<b>Abbildung 6. Verteilung des N-Status des Tumorkollektivs in Abhängigkeit vom HPV-Status</b>	<b>44</b>
<b>Abbildung 7. Kaplan-Meier-Analyse zur Darstellung des OS in Abhängigkeit von der Lymphknotenmetastasierung bei HPV-negativen Tumoren des Tumorkollektivs .....</b>	<b>45</b>
<b>Abbildung 8. Kaplan-Meier-Analyse zur Darstellung des OS in Abhängigkeit von der N- Klassifikation bei HPV-negativen Tumoren des Tumorkollektivs .....</b>	<b>45</b>
<b>Abbildung 9. Kaplan-Meier-Analyse zur Darstellung des OS in Abhängigkeit von der Lymphknotenmetastasierung bei HPV-positiven Tumoren des Tumorkollektivs</b>	<b>46</b>
<b>Abbildung 10. Durchschnittlicher H-Score einzelner Zellarten des Primärtumors im Vergleich. .....</b>	<b>49</b>
<b>Abbildung 11. Immunhistochemische Analysen von C5a in OPSCC.....</b>	<b>51</b>
<b>Abbildung 12. Boxplots zur Darstellung der Anzahl der Immunzellen, des H-Scores des FH und C5a in Tumorzellen abhängig vom HPV-Status.....</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 13. Scatterplot zur Darstellung der Anzahl der Immunzellen nach dem H-Score des FH in Tumorzellen. ....</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 14. Scatterplot zur Darstellung des C5a-H-Scores gegen FH-H-Score. ....</b>	<b>53</b>
<b>Abbildung 15. Scatterplot zur Darstellung des C5a-H-Scores gegen FH-H-Score für HPV- negative und HPV-positive Tumore.....</b>	<b>54</b>
<b>Abbildung 16. Boxplots zur Darstellung der Immunzellzahl und H-Score des FH in Tumorzellen in Abhängigkeit vom Tabakkonsum.....</b>	<b>55</b>
<b>Abbildung 17. Boxplots zur Darstellung des C5a-H-Scores von Tumorzellen in Abhängigkeit vom N-Stadium bei Rauchern. ....</b>	<b>56</b>
<b>Abbildung 18. Boxplots zur Darstellung des durchschnittlichen H-Scores von C5a in Abhängigkeit von N-Kategorie bei (A) und (B) HPV-negativen Tumoren und (C) und (D) HPV-positiven Tumoren.....</b>	<b>58</b>
<b>Abbildung 19. Boxplots zur Darstellung der Anzahl der Immunzellen und des H-Scores von FH in Tumorzellen in Abhängigkeit vom N-Stadium bei p16-negativen Tumoren.....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 20. Boxplots zur Darstellung der Anzahl der Immunzellen und des H-Scores von FH in Tumorzellen in Abhängigkeit vom N-Stadium bei p16-positiven Tumoren.....</b>	<b>60</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 21. Kaplan-Meier-Analysen zur Darstellung des OS in Abhängigkeit vom C5a-H-Score von Tumorzellen.....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 22. Kaplan-Meier-Analysen zur Darstellung des OS in Abhängigkeit vom FH-H-Score von Tumorzellen.....</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 23. Kaplan-Meier-Analysen zur Darstellung des OS in Abhängigkeit von der Immunzellzahl.....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 24. Boxplots zum Vergleich des H-Scores von Tumorzellen in Abhängigkeit von der Lokalisation.....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 25. Scatterplot zur Darstellung des C5a-H-Scores gegen FH-H-Score von Tumorzellen der Lymphknotenmetastase.....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 26. Scatterplot zur Darstellung der Immunzellzahl der Lymphknotenmetastase gegen FH-H-Score von Tumorzellen der Lymphknotenmetastase.....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 27. Kaplan-Meier-Analysen zur Darstellung des OS in Abhängigkeit von der Immunzellzahl in Lymphknotenmetastasen. ....</b>	<b>66</b>
<b>Abbildung 28. Boxplots zur Darstellung der Immunzellzahl in Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit vom Tabakkonsum und HPV-Status. ....</b>	<b>66</b>

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1. TNM-Kategorie in der 7. Auflage für OSCC .....</b>	<b>5</b>
<b>Tabelle 2. TNM-Kategorie in der 8. Auflage für OSCC .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabelle 3. Gruppen von Tumorstadien beim Oropharynxkarzinom, 8. Auflage .....</b>	<b>7</b>
<b>Tabelle 4. Geräteübersicht in alphabetischer Reihenfolge .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 5. Materialübersicht in alphabetischer Reihenfolge .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 6. Reagenzienübersicht in alphabetischer Reihenfolge .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabelle 7. Übersicht der verwendeten Antikörper in alphabetischer Reihenfolge .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle 8. Klinisch-pathologische Parameter des Tumorkollektivs .....</b>	<b>47</b>
<b>Tabelle 9. Klinisch-pathologische Parameter des Lymphknotenmetastasenkollektivs .....</b>	<b>48</b>

## 1 Einleitung und Hypothese

Krebserkrankungen der oberen Schluck- und Atemwege stellen die sechsthäufigste Tumorerkrankung weltweit dar und [1] werden nach Histologie – häufigster Vertreter ist das Plattenepithelkarzinom (HNSCC) – und anatomischer Lokalisation eingeteilt. Etwa 0,5 % der malignen Neuerkrankungen 2020 betreffen laut der globalen Krebsstatistik den Oropharynx [2]. Dabei können vier Teilbereiche im Oropharynx, der Zungengrund, der weiche Gaumen, die Tonsillen und der sonstige Oropharynx, unterschieden werden [3]. Das Plattenepithelkarzinom des Oropharynx erhielt unter den Kopf-Hals-Tumoren besondere Aufmerksamkeit, da die Inzidenz weltweit im Gegensatz zu den Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Larynx ansteigend war [3, 4]. Zu den Risikofaktoren gehören der exzessive Alkoholkonsum und Tabakkonsum. Trotz rückläufigen Tabakkonsums zeigt das Oropharynxkarzinom eine zunehmend steigende Tendenz in vielen Ländern [3]. Sie ist wahrscheinlich auf die steigenden HPV-Infektionszahlen zurückzuführen [5]. Risikofaktoren für die HPV-Infektion sind die hohe Anzahl von Sexualpartnern, der praktizierte Oral- und Analverkehr sowie die Immundefizienz [6]. HPV-assoziierte Tumore zeigen in mehreren Studien ein besseres Therapieansprechen, und somit eine bessere Prognose. Bis heute sind leider die Therapiemöglichkeiten der Kopf-Hals-Tumore begrenzt und die mediane 5-Jahres-Überlebensrate beträgt etwa 60 % [1]. Bei Krebsentstehung, Wachstum und Ausbreitung in Umgebung und metastatischen Lokalisationen wird davon ausgegangen, dass Tumorzellen gezielt der Überwachung und Bekämpfung des Immunsystems entweichen können. Die Hypothese wird dadurch unterstützt, dass Tumore häufiger bei immungeschwächten Patienten auftreten. Deshalb wird sehr aktiv nach diesen Mechanismen und möglicher Einflussnahme geforscht. Sowohl das erworbene als auch das angeborene Immunsystem besitzen die Fähigkeit zur Tumorbekämpfung. Nach dem Immunoediting-Modell gibt es drei Möglichkeiten. Entweder gewinnt der Tumor, er verliert oder man befindet sich im Zustand des Äquilibrium [7]. Bareke beruft sich auf die Red Queen Hypothese und fügt hinzu, dass es dem Tumor nur gelingt, dem Immunsystem auf Dauer zu entgehen, wenn sich Tumorzellen kontinuierlich aktiv weiterentwickeln. Eine wichtige Grundlage für diese Evolution bildet die chronische Inflammation [7] in der Tumormikroumgebung, die auch vom Komplementsystem als Teil des angeborenen Immunsystems beeinflusst wird. Das Komplementsystem stellt eine Kaskade aus mehr als 50 verschiedenen Proteinen dar, die in der Bildung eines Membranangriffskomplexes mündet, der wiederum zur Abtötung des Pathogens dient. Neben der Funktion bei der unspezifischen Immunabwehr beeinflusst das Komplementsystem allerdings auch die Aktivierung des spezifischen Immunsystems.

## Einleitung und Hypothese

Die Kaskade des Komplementsystems kann durch endogene Hemmstoffe und Proteine unterbrochen werden. Es ist bereits bekannt, dass viele Tumorarten mit einer erhöhten Konzentration von Negativregulatoren des Komplementsystems vergesellschaftet sind. Eigene Vorarbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass die Hemmung endogener Komplementinhibitoren die Wirksamkeit von zum Beispiel bereits bekannter therapeutischer Antikörper steigert. Einige Komplementkomponenten stehen allerdings im Verdacht, dass sie das Tumorwachstum fördern können.

Mit dieser Dissertation sollte überprüft werden, inwiefern ein Zusammenhang zwischen der Komplementaktivität und dem onkologischen Outcome bei Oropharynxkarzinomen besteht.

Um diesem näher zu kommen, wurden histologische Schnitte von Oropharynxtumoren und Lymphknotenmetastasen auf das Vorhandensein endogener Komplementinhibitoren untersucht. Außerdem wurde anhand der vorhandenen Patientendaten untersucht, ob Assoziationen zwischen Verteilung, Färbungsintensität der Komplementinhibitoren mit verschiedenen Tumor- und Patienteneigenschaften bestehen.

Langfristig gilt es herauszufinden, ob ein Eingreifen in die Komplementreaktion mittels Hemmung endogener Komplement-Inhibitoren eine therapeutische Option darstellt.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Das plattenepitheliale Oropharynxkarzinom**

#### **2.1.1 Inzidenz**

Laut der globalen Krebsstatistik machte das Oropharynxkarzinom mit 98412 neu gemeldeten Fällen etwa 0,5 % der malignen Neuerkrankungen im Jahr 2020 aus [2].

Die Inzidenz der HPV-assoziierten Tumore, wie das Oropharynxkarzinom, zeigt eine zunehmende Tendenz [8]. Studien zeigen, dass das HPV bei in etwa 25 % aller Kopf-Hals-Tumore, und bei bis zu 60 % aller Oropharynxtumore, involviert ist [9]. Dabei kommen HPV-positive Tumore im Vergleich zu anderen Pharynxabschnitten prädominant im Oropharynx vor [10]. Das Plattenepithelkarzinom des Oropharynx erhielt unter den Kopf-Hals-Karzinomen in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit, da die Inzidenz trotz rückläufigen Tabakkonsums weltweit ansteigend war. In den USA schätzt man eine Steigerung der Inzidenz des HPV-positiven Oropharynxkarzinoms von 225 % zwischen 1988 und 2004 [11]. In Deutschland schätzt man eine HPV-Prävalenz von etwa 40 % [5].

#### **2.1.2 Anatomie**

Der Oropharynx wird anatomisch nach ventral hin durch die Gaumenbögen (Arcus palatoglossus und Arcus palatopharyngeus), nach kranial durch die Ebene des Gaumensegels, nach kaudal durch den Oberrand der Epiglottis im Bereich des Zungengrundes abgegrenzt. Der Oropharynx wird in vier Teilbereiche eingeteilt, den Zungengrund, weichen Gaumen, die Tonsillen und den sonstigen Oropharynx. 90 % der Kopf-Hals-Karzinome sind Plattenepithelkarzinome. Das lymphoretikuläre Gewebe, das unter dem mehrschichtig, unverhornten Plattenepithel liegt, wird zum Waldeyer-Rachenring gezählt [12].

#### **2.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren**

Die Risikofaktoren des Oropharynxkarzinoms sind der Alkohol- und Tabakkonsum.

Mit zunehmender Tendenz tritt die Infektion mit dem humanen Papillomvirus als Risikofaktor hervor. Zwölf von 200 Virustypen von HPV werden zurzeit als onkogen eingestuft. Darunter sind vor allem HPV 16 und 18 bei 85 % der Fälle der HPV-assoziierten Oropharynxkarzinome verantwortlich [3]. Auffällig ist, dass Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren mit einem Durchschnittsalter von 54 Jahren deutlich jünger und weniger Komorbiditäten, einen hohen

sozioökonomischen Status und geringes Rauchverhalten aufweisen. Männer sind mit einem Faktor von 2,8 häufiger betroffen [4].

#### **2.1.4 Klinik und Histologie**

In einer Auswertung von Patientendaten mit Oropharynxkarzinomen, die in Gießen im Zeitraum von 2011–2013 behandelt wurden, wurde analysiert, wie sich die primäre Symptomatik abhängig von der HPV-Assoziation unterscheidet [3]. Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen wiesen als primäre Symptomatik eine fortgeschrittene Lymphknotenmetastasierung auf, das bekanntermaßen sich negativ auf die Prognose auswirkt [3]. Auf histologischer Ebene handelt es sich dabei meist um zystische Lymphknotenmetastasen [6]. Patienten mit HPV-negativen Tumoren sind meist aufgrund von Schluckbeschwerden durch den vergrößerten Primärtumor beim Arzt vorstellig. Die Inzidenz zur Fernmetastasierung abhängig vom HPV-Status ist noch umstritten. Dok et al. konnten keine Unterschiede bezüglich der Häufigkeit der Fernmetastasierung bei Kopf-Hals-Tumoren zwischen HPV-negativen und HPV-positiven Patienten beobachten. Interessanterweise bilden sich bei HPV-positiven Patienten Fernmetastasen in der Leber oder im Gehirn, während bei HPV-negativen Patienten vor allem die Lunge oder der Knochen betroffen sind. Darüber hinaus wurden bei HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren Fernmetastasen auch nach einem Follow-up von 5 Jahren festgestellt, bei HPV-negativen Patienten gab es in der Regel nach 2 Jahren keine Anzeichen auf Fernmetastasierung [13]. Im Kontrast dazu, berichten Ward et al. von einer geringeren Entwicklung eines Sekundärtumors bei HPV-positiven Patienten [14].

Im Weiteren ist noch hinzuzufügen, dass es noch keine klare Evidenz für spezifische präkanzeröse Läsionen für HPV-assoziierte OPSCC gibt [4, 6]. Histologisch gesehen, zeigen sich bei HPV-positiven Tumoren erstaunlicherweise seltenst Verhornungen. Chernock beschreibt folgendermaßen die Histologie der HPV-assoziierten Tumore. Sie sind „meist vom nicht keratinisierenden Typ, tendieren zur Bildung von großen Nestern mit verdrängendem Wachstum und geringer stromaler Antwort, zahlreichen Mitosen und zentraler Nekrose des Komodos. Die Zellen sind ovoid bis spindelförmig mit unscharfer Begrenzung und besitzen einen hyperchromatischen Nucleus mit nicht prominentem Nucleolus. Die Epithelreifung ist begrenzt.“ (übersetzt durch den Autor) [15]. Als mögliche Gründe für dieses histologische Erscheinungsbild erwähnt Chernock zum einen die durch das Virus induzierte genetische Veränderung. Zum anderen ist es auf die Herkunft der HPV-positiven Tumore zurückzuführen. HPV-positive Tumore des Oropharynx kommen gehäuft in der Tonsillengegend vor. Das Tonsillenepithel ist durch geringe Zellmaturation und starke Lymphozyteninfiltration gekennzeichnet [15].

### 2.1.5 Diagnostik und Staging

Bei klinisch auffälligem Oropharynx im Rahmen einer Laryngoskopie wird das Biopsat histopathologisch genauer untersucht. Zur Ausbreitungsdiagnostik werden bildgebende Verfahren und weitere endoskopische Untersuchungen angeschlossen.

Das Staging erfolgt anhand der TNM-Klassifikation, die seit 1950 von der Union internationale contre le cancer (UICC) eingeführt wurde. Dabei beurteilt die T-Kategorie die Ausdehnung des Primärtumors, die N-Kategorie das Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung und die M-Kategorie das Vorhandensein von Fernmetastasen. Nach der TNM-Klassifikation werden die Tumore weiter in UICC-Stadien eingeteilt. Nach der 2017 aktualisierten 8. Auflage des TNM-Klassifikationssystems der UICC/AJCC wird das HPV-assoziierte Oropharynxkarzinom als eigene Entität gewertet. Die Änderungen hinsichtlich der Klassifizierung betrafen sowohl HPV-positive als auch HPV-negative Tumore. Bei p16-negativen Tumoren wird die N3-Kategorie abhängig vom Vorhandensein des extranodalen Wachstums weiter unterteilt in N3a (Lymphknotenmetastase > 6 cm) und N3b (Lymphknotenmetastase mit Kapseldurchbruch) [16]. Bei p16-positiven Tumoren wird das bessere Überleben berücksichtigt, dass bei ihnen ein UICC-Downstaging beobachtet werden kann. Beachtenswert ist die Klassifizierung von HPV-assoziierten Oropharynxtumoren in das UICC-Stadium IV nur noch bei Vorhandensein einer Fernmetastase [16]. Hinzugekommen ist auch die Unterscheidung zwischen der c (klinisch)- und p (pathologisch)-Kategorie bei Bestimmung des N-Status. Dabei steht cN1 für ipsilateralen Befall mit Lymphknotenmetastasen  $\leq 6$  cm, cN2 für beidseitigen oder kontralateralen Befall mit Lymphknotenmetastasen  $\leq 6$  cm und cN3 für Metastasen > 6 cm. Die postoperative pathologische Bestimmung des N-Status besteht nur noch in der Einteilung in pN1 und pN2. Dabei wird die Größe der Lymphknotenmetastase nicht mehr berücksichtigt [16].

**Tabelle 1. TNM-Kategorie in der 7. Auflage für OSCC**

TNM 7. Auflage	
T	
c/p T1	$\leq 2$ cm
c/p T2	$> 2$ cm, $\leq 4$ cm
c/p T3	$> 4$ cm oder Ausbreitung auf linguale Epiglottis
c/p T4a	Infiltration Larynx, äußere Zugenmuskulatur, Hartgaumen, Mandibula
c/p T4b	Infiltration M. pterygoideus lateralis, Schädelbasis, ACI
N	
c/p N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
c/p N1	Ipsilateral solitär $\leq 3$ cm
c/p N2a	Ipsilateral solitär $> 3$ – $6$ cm
c/p N2b	Ipsilateral multiple $\leq 6$ cm
c/p N2c	Bilateral, kontralateral $\leq 6$ cm
c/p N3	Metastasen $> 6$ cm

Tabelle übernommen von [17] (Quelle: Wittekindt et al., 2018).

**Tabelle 2. TNM-Kategorie in der 8. Auflage für OSCC**

<b>TNM 8. Auflage</b>			
<b>p16-negativ</b>		<b>p16-positiv</b>	
T		T	
c/p T1	≤ 2 cm	c/p T1	≤ 2 cm
c/p T2	> 2 cm, ≤ 4 cm	c/p T2	> 2 cm, ≤ 4 cm
c/p T3	> 4 cm oder Ausbreitung auf linguale Epiglottis	c/p T3	> 4 cm oder Ausbreitung auf linguale Epiglottis
c/p T4a	Infiltration Larynx, äußere Zungenmuskulatur, Hartgaumen, Mandibula, Lamina med. Processus pterygoideus	c/p T4	Infiltration Larynx, äußere Zungenmuskulatur, Lamina med./lat. Processus pterygoideus, Hartgaumen, Mandibula, M. pterygoideus lateralis, Schädelbasis, ACI, lat. Nasopharynx
c/p T4b	Infiltration M. pterygoideus lateralis, Schädelbasis, ACI		
c N		c N	
c N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	c N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
c N1	Ipsilateral solitär ≤ 3 cm	c N1	Ipsilateral solitär oder multipel ≤ 6 cm
c N2a	Ipsilateral solitär > 3–6 cm	c N2	Kontralateral oder bilateral ≤ 6 cm
c N2b	Ipsilateral multipel ≤ 6 cm		
c N2c	Bilateral, kontralateral ≤ 6 cm		
c N3a	Metastasen > 6 cm	c N3	Metastasen > 6 cm
c 3b	ECS		
p N		p N	
p N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	p N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
p N1	Ipsilateral solitär ≤ 3cm	p N1	≤ 4 betroffene Lymphknoten
p N2a	Ipsilateral solitär, ≤ 3 mit ECS oder ≤ 6 cm ohne ECS	p N2	≥ 5 betroffene Lymphknoten
p N2b	Ipsilateral multipel ≤ 6 cm ohne ECS		
p N2c	Bilateral, kontralateral ≤ 6 cm ohne ECS		
p N3a	Metastasen > 6 cm, kein ECS		
p N3b	Metastasen > 3 cm mit ECS oder kontra-/bilateral mit ECS		

Tabelle übernommen von [17] (Quelle: Wittekindt et al., 2018).

**Tabelle 3. Gruppen von Tumorstadien beim Oropharynxkarzinom, 8. Auflage**

<b>p16-negativ</b>				<b>p16-positiv</b>			
Stadium				Stadium	Klinisch		
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0	I	T1, T2	N0, N1	M0
II	T2	N0	M0	II	T1, T2	N2	M0
III	T3	N0	M0		T3	N0, N1, N2	M0
	T1, T2, T3	N1	M0	III	T1, T2, T3, T4	N3	M0
IVA	T4a	N0, N1	M0		T4	Jedes N	M0
	T1, T2, T3, T4a	N2	M0	IV	Jedes T	Jedes N	M1
IVB	Jedes T	N3	M0				
	T4b	Jedes N	M0				
IVC	Jedes T	Jedes N	M1	Stadium	patholo- gisch		
				0	Tis	N0	M0
				I	T1, T2	N0, N1	M0
				II	T1, T2	N2	M0
					T3	N0, N1	M0
				III	T3, T4	N2	M0
				IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle übernommen von [17] (Wittekindt et al., 2018).

### 2.1.6 Therapie und Prognose

Die Therapie von Oropharynxkarzinomen läuft multimodal. Man unterscheidet hierbei zwischen der primär radiotherapeutischen und primär chirurgischen Therapie. Die Strahlentherapie wird bevorzugt in den USA und in einigen europäischen Ländern wie in den Niederlanden eingesetzt [3]. Von vielen Autoren wird die kombinierte Cisplatin-basierte Chemoradiotherapie und Strahlentherapie als standard-of-care treatment bezeichnet [18]. Die primär chirurgische Therapie wird in Deutschland bevorzugt. 80 % erhalten die Strahlentherapie als adjuvante Therapie [3].

Es ist wohl bekannt, dass die HPV-Assoziation des Tumors auf ein besseres Therapieansprechen, und damit verbunden, auf eine bessere Prognose hindeutet. In der Datenauswertung von Patienten mit OPSCC, die in Gießen im Zeitraum von 2011–2013 behandelt wurden, liegt das Gesamtüberleben nach 5 Jahren bei Patienten mit HPV-Assoziation über 80 % und bei Patienten mit HPV-negativen Tumoren bei 40–50 % [3]. Wie bereits erwähnt, ist es noch umstritten, ob bei HPV-positiven Tumoren ein geringeres Risiko zur Entwicklung eines Sekundärtumors besteht. Die Gruppe von Ward et al. beobachteten eine geringere Inzidenz und führen es auf die fehlende Feldkanzerisierung bei HPV-positiven Tumoren zurück [14]. Allerdings gibt es auch eine Gruppe der HPV-positiven Tumore, die einen sehr aggressiven Verlauf zeigen [19].

Die Patienten werden heute noch unabhängig vom p16-Status behandelt [11]. Nebenwirkungen der Chemotherapie sind die Xerostomie, Mukositis, pharyngeale Stenose und Dysphagie, Infektionen und die laryngeale Narbenbildung [20]. Nebenwirkungen der Radiotherapie sind unter anderem die Xerostomie, Wundheilungsstörungen und die Osteoradionekrose des Unterkiefers.

Um die Nebenwirkungen der Chemotherapie und der Strahlentherapie zu minimieren, werden heute neue Therapieformen vorgeschlagen. Die Deeskalationsstrategien sollen aber nur bei Patienten mit einem niedrigen Risiko eingesetzt werden [21]. Velazquez et. al entwarfen ein Nomogramm, das die Patienten mithilfe von den Parametern, HPV-Status, T-Stadium, N2b-N3-Stadium, Komorbiditätsscore, Tabakkonsum und Geschlecht, in Risikogruppen einteilt. Viele Autoren sind sich einig, dass auch unter den HPV-positiven Patienten eine Differenzierung nötig ist [19], wobei multifaktorielle Aspekte, darunter immunbezogene, tumorbezogene und patientenbezogene Gesichtspunkte, eingeschlossen werden sollten [19].

Unter den Deeskalationsstrategien gibt es die Reduktion oder sogar Substitution der Chemotherapie wie beispielsweise durch die Substitution von Cisplatin mit Cetuximab. Beim Cetuximab handelt es sich um einen EGFR-Inhibitor. Eine weitere Strategie ist die Reduktion der totalen Dosis der Radiotherapie wie beispielsweise durch eine Kombinationstherapie mit Cetuximab [21]. Heute werden immer mehr immun-onkologische Therapieansätze vorgestellt, die auf Immun-Checkpoints ausgerichtet sind. Vielversprechend sind neutralisierende Antikörper gegen das PD-1/PD-L1 (programmed death receptor 1/ligand 1), das vor allem bei inflammatorischen Oropharynxkarzinomen effektiver sein soll [22].

Außerdem trat die minimalinvasive Chirurgie in den letzten Jahren in den Vordergrund. Darunter gibt es die Transorale Laser Mikrochirurgie oder die Transorale Roboter Chirurgie.

Zuletzt soll noch die Möglichkeit der Prävention erwähnt werden. Die kürzlich von der ständigen Impfkommision des RKIs (STIKO, 90. Sitzung am 05.06.2018) ausgesprochene Empfehlung, auch Jungen im Alter von 9–14 Jahren gegen HPV zu impfen, ist fundamental zur Vermeidung HPV-induzierter Erkrankungen [3].

## **2.2 Das humane Papillomvirus**

### **2.2.1 Charakterisierung des HPV**

Die humanen Papillomviren sind unbehüllte DNA-Viren, die das kutane oder mukosale Gewebe infizieren [9]. In der westlichen Zivilisation wird die HPV-Infektion für fast alle Zervixkarzinome, über 90 % der Analkarzinome, 70 % der Oropharynxkarzinome, 70 % der Vaginalkarzinome, 40 % der Vulvakarzinome und für 50 % der Peniskarzinome verantwortlich gemacht [23]. Mehr als 200 verschiedene HPV-Genotypen sind heute bekannt [24]. Abhängig vom onkogenen Potential werden die HP-Viren in zwei Gruppen, den „low risk groups“ und „high risk groups“ eingeteilt [25]. Die am häufigsten vorkommenden Subtypen der Hochrisikogruppe des HPV sind das HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 und 56 [9]. Dabei ist der Subtyp HPV 16 mit einer Prävalenz von mehr als 80 % bei Oropharynxkarzinomen am häufigsten beteiligt [24].

Die DNA des HPV16 besteht aus 7908 Basenpaaren und lässt sich in drei Hauptregionen, eine nicht-kodierende Region für die Regulation der DNA-Replikation und Expression, eine frühe Region mit den Genen E1, E2, E4, E5, E6 und E7 und zuletzt in eine späte Region mit den Genen L1 und L2, unterteilen [25]. Mittels der Kapsidproteine L1 und L2 wird die gewebespezifische Infektion ermöglicht. Die Replikation wird von den Proteinen E1 und E2 kontrolliert. Verantwortlich für die Onkogenese sind die Proteine E5, E6 und E7 [9]. Das Protein E6 hemmt die Apoptose und E7 fördert im Gegenzug die unkontrollierte Zellproliferation [3, 9]. Dabei verhindert das E6 die Aktivität des Tumorsuppressors p53, während das E7 über das Retinoblastomprotein wirkt. Der Mechanismus des E5 ist noch unerforscht [9]. Außerdem ist bekannt, dass eine kontinuierliche Expression von E6 und E7 für die maligne Transformation erforderlich ist [25].

Die Expression der viralen Proteine findet ausschließlich intrazellulär statt, so dass die infizierten Zellen recht unauffällig für das Immunsystem sind [3]. Es wird daher vermutet, dass weniger genetische Veränderungen bei HPV-assoziierten Tumoren vorliegen und eine spezifische, zielgerichtete Therapie aussichtsreich sein sollte [3].

### **2.2.2 Abwehrmechanismen des Wirts und Evasionsmechanismen des HPV**

Mittels verschiedener Abwehrmechanismen gegenüber des HP-Virus gelingt es dem Wirt das HPV zu eliminieren. Eine physikalische Barriere stellt die Mukosa mit der Zellmembran dar. Anders als in der Zervix, ist das Tonsillenepithel netzartig, so dass ein mukosales Trauma keine Voraussetzung für die virale Exposition der Basalzellen ist. Möglicherweise erleichtert die stel-

lenweise unterbrochene Basalmembran die Invasion und Metastasierung [26]. Auch nach Überwindung dieser Barriere sind in der extrazellulären Matrix Proteasen vorhanden, die die Internalisierung des Virus erleichtern, so dass sie intrazellulär eliminiert werden. Außerdem ist das angeborene Immunsystem an seiner Eliminierung beteiligt. Darunter gibt es zytosolische DNA-Sensoren, wie das Absent in melanoma 2 (AIM2), Interferon- $\gamma$  inducible Protein 16 (IFI16) und das cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate syntase (cGAS), die die DNA des Virus erkennen und zur Viruselimination beispielsweise über die erhöhte Produktion von Typ-I-Interferon beitragen. Zudem gelingt die Abwehr mithilfe von unspezifischen Immunzellen, darunter gibt es die dendritischen Zellen, Langerhans-Zellen und natürlichen Killerzellen [27]. Auch die spezifischen Abwehrzellen, die T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, sind wichtige Akteure zur Bekämpfung des HPV.

Trotz der oben genannten Abwehrmechanismen gelingt es dem HPV über zahlreiche Evasionsmechanismen das Immunsystem des Wirts zu umgehen. Denn viele Studien belegen, dass HPV-positive Tumore mit einer erhöhten Anzahl an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) assoziiert sind. Dennoch ist der Körper nicht dazu fähig, das HP-Virus erfolgreich zu bekämpfen. Zum einen verhindert das Virus die Antigenpräsentation über das HPV E5 Protein, so dass keine Aktivierung der T-Zellen möglich ist [28]. Darüber hinaus scheint das Virus auch die Funktion der NK-Zellen zu beeinträchtigen. Nichtsdestotrotz korreliert der Spiegel an cytotoxischen NK-Zellen mit dem Outcome der Patienten mit HPV-positivem Oropharynxkarzinom [28]. Außerdem belegen Studien, dass vielmehr der Phänotyp als die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen entscheidend für die antitumorale Immunaktivität ist. Beispielsweise ist bereits bekannt, dass ein Subtyp der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Tregs), die antitumorale Immunität unterdrücken [28]. Überdies zeigen zahlreiche Studien, dass der cGAS/STING-Signalweg durch das HP-Virus beeinflusst wird, in dem das E7-Protein die STING-Aktivierung herunterreguliert und die Produktion des Typ-I-Interferon hemmt [28]. Ferner wird der Signalweg PD-1/PD-L1 möglicherweise über das HP-Virus reguliert. Eine Analyse von 27 Kopf-Hals-Tumoren deutet auf eine erhöhte PD-L1-Expression bei HPV-positiven Tumoren hin [28]. Die Expression des PD-L1 wird über die erhöhte IFN- $\gamma$ -Sekretion von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten hochreguliert. Shamseddine schließt nicht aus, dass die erhöhte PD-L1-Expression und der HPV-Status nicht kausal zusammenhängen, sondern die Erhöhung durch die entzündliche Tumormikroumgebung mit erhöhten TIL-Zahlen zustande kommt [28].

### **2.2.3 Diagnostik des HP-Virus**

Bis heute gibt es keine einheitlich festgelegte Detektionsmethode des HPV [9]. Als Goldstandard gilt die Amplifikation der viralen RNA mittels Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion

[9]. Daneben gibt es die Immunhistochemie des p16, die Detektion der HPV-DNA mittels In-situ-Hybridisierung oder PCR [9, 24].

In vielen Studien werden nach weiteren Biomarkern als das p16-Protein gesucht.

Von vielen Autoren wird betont, dass der alleinige p16-Nachweis nicht ausreichend ist, da 20 % der p16-positiven Oropharynxkarzinome negativ bezüglich ISH oder PCR-HPV-Tests sind. Bei diesen Patienten ist eine nicht vergleichbare Prognose wie bei doppelt, mit anderen Worten sowohl für das Protein als auch für die DNA, positiv getesteten Patienten zu erwarten [21].

Interessanterweise ist das p16 nicht nur als Biomarker für HPV-Infektionen geeignet, sondern gibt auch Hinweis auf ein besseres Survival bei Oropharynx Tumoren [10].

#### **2.2.4 Das p16-Protein**

Das p16-Protein wird auch als „Cyclin dependent kinase inhibitor“, abgekürzt CDK-inhibitor 2A, bezeichnet. Das Protein p16 gehört, neben p15, p18 und p19, zur INK4 Familie. Das Gen befindet sich auf Chromosom 9 Positionsband 21.3 (9p21.3) [29].

Mittels alternativen Spleißens können vier verschiedene Transkripte entstehen, darunter das p16(INK4a), der zyklin-abhängige Kinaseinhibitor, das p14ARF, das p12 und p16 $\gamma$ .

Das p16 ist an der Zellzyklusregulation beteiligt, in dem es die Proliferation negativ beeinflusst. Dabei bindet das p16 die zyklinabhängigen Kinasen 4 und 6, wodurch das Retinoblastomprotein (pRb) nicht phosphoryliert werden kann. Im hypophosphorylierten Zustand bindet das Retinoblastom den Transkriptionsfaktor E2F, sodass die Transkription von Genen, die mit der Proliferation assoziiert sind, nicht möglich ist. Folglich wird der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus verhindert [29].

Serra et al. bezeichnen das p16 nach dem p53 als zweithäufigstes Tumorsuppressorgen. Viele Tumore sind mit einer Mutation des Gens assoziiert. Liggett und Sidransky berichten bei Kopf-Hals-Tumoren von einer homozygoten Deletion des Gens von 50 % und von einer Mutation von 10 %. Daneben wird die Vermutung gebracht, dass p16 möglicherweise einerseits die Angiogenese hemmen und andererseits die Lymphangiogenese fördern könnte [13].

Das p16-Protein wird als Surrogatmarker zur Diagnostik HPV-assoziiertes HNSCC verwendet, denn bei HPV-negativen Tumoren liegt p16 meist inaktiviert vor und ist immunhistochemisch kaum oder wenig nachweisbar [3]. Die Wirkung des p16-Proteins weicht allerdings bei HPV-positiven Tumoren stark von anderen Tumoren ab. Verantwortlich dafür ist die Funktion des Onkoproteins E7, das vom humanen Papillomvirus exprimiert wird. Das E7 führt zur Degradation des Retinoblastomproteins, das das Zielprotein des p16-Proteins ist [30]. Außerdem berichtet Li auch von einer onkogenen Aktivität des p16-Proteins.

## 2.3 Die lymphogene Metastasierung

### 2.3.1 Das lymphatische System

Das lymphatische System dient der Homöostase, Flüssigkeitsbalance, dem Immunsystem und der Fettabsorption und seinem Transport [31] und setzt sich aus Lymphgefäßen und den lymphatischen Organen zusammen [32]. Die primären lymphatischen Organe dienen zur Differenzierung der Lymphozyten aus Stammzellen, ihrer Vermehrung und Reifung. Zu den primären lymphatischen Organen zählen der Thymus und das Knochenmark. In den sekundären lymphatischen Organen gelangen die Lymphozyten in Kontakt mit den Antigenen. Die sekundären lymphatischen Organe bilden die Milz, Lymphknoten und mukosaassoziierte lymphatische Organe, darunter die Tonsillen, Peyer-Plaques und bronchusassoziierte lymphatische Organe [33]. Das Lymphgefäßsystem ist durch einen blinden Beginn gekennzeichnet, die kleinsten Lymphgefäße werden als initiale Lymphgefäße bezeichnet [34]. Ihre Funktion besteht darin, interstitielle Flüssigkeit aufzunehmen [34]. Erstaunlicherweise weisen die initialen Lymphgefäße keine Tight Junctions wie Blutkapillaren auf. Die lymphatischen endothelialen Zellen bilden diskontinuierliche interzelluläre Junctions [34]. Der lymphatische Rückstrom wird durch Klappen verhindert, die sich öffnen, wenn der Flüssigkeitsdruck im Interstitium steigt [34]. Die initialen lymphatischen Gefäße konvergieren zu größeren Sammelgefäßen [34], deren Endothelzellen allerdings durch kontinuierliche Junctions verbunden sind. Diese Sammelgefäße bestehen aus einer zusätzlichen Muskelschicht [34]. Mithilfe der Gefäßkontraktion der Muskelzellen und der Klappen wird der unidirektionale Lymphfluss ermöglicht [34]. Die Sammelgefäße transportieren die Lymphe zu Lymphknoten. Die afferente Lymphe tritt in den Randsinus ein, der sich unter der fibrösen Kapsel des Lymphknotens befindet [33]. Danach gelangt die Lymphe über den Intermediärsinus und Marksinus zum efferenten Lymphgefäß. Das Parenchym des Lymphknotens lässt sich in eine kortikale B-Zone und parakortikale T-Zone und Mark unterteilen [33]. In der B-Zell-Zone befinden sich die Lymphfollikel, in denen naive B-Zellen in Kontakt mit den Antigenen gelangen und sich entweder zu Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen differenzieren. In der parakortikalen Zone, in der sich auch sogenannte hochendotheliale Venolen (HEV) befinden, werden die T-Zellen durch Antigenstimulation aktiviert. Die Immunzellen gelangen über die HEV oder über die afferenten Lymphgefäße in den Lymphknoten [34]. Die Lymphgefäße drainieren in die Venenwinkel und somit steht das Lymphgefäßsystem mit dem Blutgefäßsystem in unmittelbarer Verbindung. Ob die hämatogene Metastasierung mit der lymphogenen Metastasierung zusammenhängt, wird stark kontrovers diskutiert. Viele Autoren bezeichnen die lymphogene Metastasierung als Endstation [35], während andere die lymphogene Metastasierung als Zwischenstation ansehen [34].

### 2.3.2 Die Lymphknotenmetastasierung

Die Erhöhung der Invasivität der Tumorzellen durch die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist sehr bedeutsam für die Metastasierung. Dabei beeinflusst die EMT nicht nur die Fernmetastasierung, sondern auch die Lymphknotenmetastasierung [34]. Tumorzellen, die mit einer erhöhten Expression von EMT-assoziierten-Transkriptionsfaktoren assoziiert sind, zeigen über die erleichterte Degradation der extrazellulären Matrix durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine stärkere Tendenz zur Lymphknotenmetastasierung [34].

Die Tumorzellen gelangen nicht nur mechanisch durch den interstitiellen Druck in die Lymphgefäße. Die Migration in die Lymphgefäße wird chemotaktisch unterstützt [34]. Anhand von Xenograft-Modellen des humanen Melanoms konnten Rofstad et al. eine Assoziation des erhöhten interstitiellen Drucks (IFP) mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen erkennen [34]. Shields et al. konnten zeigen, dass die Tumorzellen des Brusttumors CCR7-Liganden (CC-Chemokinrezeptor 7-Liganden) sezernieren und auf diese Weise einen autologen Gradienten bilden, der wiederum die Tumorzellen zur Lymphknotenmetastasierung fördert [34]. Darüber hinaus konnte auch die Herstellung eines Gradienten von Chemokinen von lymphatischen Endothelzellen beobachtet werden, die die Invasion der Lymphgefäße durch Tumorzellen unterstützt [34].

Du Bois et al. beschreiben drei Veränderungen des Stromas einer Lymphknotenmetastase, darunter die Expansion der Sinus im Lymphknoten und Proliferation von lymphatischen Endothelzellen, die Dilatation der hochendothelialen Venole und die Umstrukturierung und Fibrosierung der Lymphknotenstruktur [36].

Außerdem zeigen viele Studien, dass sich die Zellpopulation einer Lymphknotenmetastase verändert. Die Zellpopulation im Lymphknoten setzt sich aus stromalen, myeloischen und lymphatischen Zellen zusammen. Beispielsweise gehören zu stromalen Zellen die fibroblastischen retikulären Zellen sowie Endothelzellen der Blut- und Lymphgefäße. Die lymphatischen Endothelzellen (LECs) sollen in der Lage sein, den Reifungsprozess der dendritischen Zellen zu beeinflussen. Die myeloischen Zellen, die nur eine kleine Gruppe im Lymphknoten bilden, scheinen dennoch die Immunzellantwort auf Tumorzellen stark zu beeinträchtigen. Hauptvertreter dieser Gruppe bilden die myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). Die MDSCs sind bekannt dafür, dass sie die regulatorischen T-Zellen (Tregs) rekrutieren und die T-Zellproliferation inhibieren [31]. Bekannt ist außerdem, dass Tumorzellen die Expression von MHC (Major Histokompatibilitätskomplex) verhindern, so dass die T-Zell-Aktivierung gehemmt wird [34]. Lymphknotenmetastasen weisen dementsprechend eine geringere Anzahl an CD8+T-Effektorzellen, eine reduzierte Maturation der dendritischen Zellen und eine Akkumulation von Tregs auf [36].

Viele sprechen auch von einer prämetastatischen Nische, und deuten darauf hin, dass die Lymphknotenveränderungen bereits vor der Metastasierung stattfinden [34].

Außerdem können die lymphatischen Endothelzellen durch Faktoren, wie das VEGF-C oder das VEGF-D, die von Tumorzellen oder Stromazellen sezerniert werden, zur Proliferation stimuliert und somit die Lymphangiogenese vorangetrieben werden. Die Lymphangiogenese soll die Lymphknotenmetastasierung begünstigen [31].

### **2.3.3 unerwünschte Nebenwirkungen der Lymphknotendissektion**

Es gibt Vermutungen, dass die Entnahme der Lymphknoten die Tumorbekämpfung negativ beeinflussen könnte. Außerdem besteht die Gefahr der Entwicklung eines Lymphödems [34] oder von Infektionen. Deswegen gibt es viele Studien, die darauf gerichtet sind, nach Biomarkern der „metastatischen Nische“ zu suchen, um die Tumor-induzierte Immunsuppression zu drehen [31].

## 2.4 Das Immunsystem: Das Komplementsystem

### 2.4.1 Die Funktion und Aktivierung des Komplementsystems

Die erworbene Immunreaktion basiert auf B- und T-Lymphozyten, die mit ihren Antikörpern, Zytokinen oder zytotoxischen Rezeptoren Tumorzellen erkennen und gegebenenfalls eliminieren. Die angeborene Immunität beruht auf der Ausschüttung von inflammatorischen Faktoren oder Zytokinen, Aktivität von NK-Zellen und des Komplementsystems. Dabei befindet sich die gegenseitige Einflussnahme der Tumorzelle und des Immunsystems ständig im Fluss [37].

Wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunantwort ist das Komplementsystem, das aus mehr als 50 verschiedenen Proteinen besteht [38, 39]. Es ist zuständig für die Opsonierung von Mikroorganismen zur Aufnahme und Abtötung in phagozytierenden Zellen, Beeinflussung der Leukotaxis, Aktivierung von Mastzellen und Granulozyten über seine Anaphylatoxine, Entsorgung von Antigen-Antikörper-Immunkomplexen [38] und Aktivierung der spezifischen Immunabwehr, v.a. ist es bedeutend für das B-Zell-Gedächtnis [37].

Das Komplementsystem kann auf drei Weisen aktiviert werden, durch den konventionellen, alternativen und den Lektin-Weg [40]. Alle drei Wege münden letztendlich in der Konversion des C3 in C3a und C3b [41]. Dabei ist C3a ein Anaphylatoxin und das C3b wirkt als Opsonin oder dient der Bildung des MAC-Komplexes.

Die Aktivierung des klassischen Weges geschieht durch mindestens 2 IgG- oder 1 IgM-Antikörper [40]. IgM ist der potenteste Aktivator des klassischen Weges, in absteigender Reihenfolge gefolgt von IgG3, IgG1 und IgG2 [42]. Weitere Initiatoren sind das CRP, Pentraxin 3, polyanionische Strukturen wie die RNA oder DNA, bestimmte extrazelluläre Matrixproteine wie beta-Amyloide, Prione, apoptotische oder nekrotische Zellen, sowie die Oberfläche von Krankheitserregern anhand von Lipopolysacchariden (LPS) [43]. Die Bindung von C1q an den Liganden führt zur Konformationsänderung und somit zur sequenziellen Aktivierung von C1r und C1s [42] und Bildung des C1-Komplexes, der C4 und C2 spaltet, sodass die C3-Konvertase geformt wird. Die Aktivierung des Lektinweges geschieht durch Kohlenhydrate wie das Mannose-bindende Lektin (MBL) oder Ficoline [40] auf pathogener Oberfläche [42]. Über die Aktivierung der Mannose-bindenden-Lektin-assoziierten Serinproteasen 1 und 2 (MASP1, MASP2) werden das C4 und C2 gespalten und die C3-Konvertase gebildet. Sowohl der klassische als auch der Lektinweg münden in der Entstehung der C3-Konvertase, dem C4b2a-Komplex. Heute wird von manchen Autoren dieser Begriff als veraltet angesehen und als C4b2b korrigiert [44].

Der alternative Weg kann über zwei Mechanismen aktiviert werden, über das C3(H<sub>2</sub>O) oder über das C3b [41] und dient zur Amplifikation des C3b. Der alternative Weg wird konstant und

spontan, Antikörper-unabhängig, aktiviert. Zum einen wird der alternative Weg durch spontanen Zerfall des instabilen Komplementfaktors C3 eingeleitet. Dieser Mechanismus wird als Tickover bezeichnet [45]. Dabei entsteht durch spontane Hydrolyse zunächst das C3(H<sub>2</sub>O), das dem C3b ähnelt [46]. Daran lagert sich der Faktor B an, der wiederum von Faktor D gespalten wird, so dass letzten Endes die C3-Konvertase des alternativen Weges, das C3(H<sub>2</sub>O)Bb, entsteht und es zur Amplifikation des C3a und C3b führt [7, 47]. Andererseits aktiviert das auf pathogenen Oberflächen gebundene C3b den Faktor B und Faktor D zur Bildung von C3bBb, einer C3-Konvertase des alternativen Weges [41]. Daneben sollen auch triviale Mengen von C3b von Enzymen des Gerinnungssystems, Plasmin oder der neutrophilen Elastase produziert werden. Auch aktiviert das C3b, das im klassischen-, alternativen-, oder Lektinweg generiert wird, den alternativen Weg [43]. Ist die Zelle pathogen, wird die Zelle für die Phagozytose opsoniert und mittels positiver Rückkopplung der alternative Weg verstärkt, in dem die C3-Konvertase des alternativen Weges (C3bBb) gebildet wird, die durch Properdin stabilisiert wird [45]. Zudem ist bekannt, dass das Properdin sogenannte pathogen-oder damage-associated molecular patterns (PAMP und DAMP) erkennen und den alternativen Weg über die erleichterte Anlagerung des C3b initiieren kann [48].

Bindet das C3b an die C3-Konvertase (C4b2a oder C3bBb), entstehen trimolekulare Komplexe, wie C4b2a3b oder C3bBb3b [49]. Dabei handelt es sich um C5-Konvertasen des klassischen bzw. alternativen Weges, die das C5 spalten und letztendlich zur Herstellung des MAC-Komplexes (Membranangriffskomplex) führen [49].

### **2.4.2 Das physiologische Äquilibrium der Komplementaktivierung**

Das Komplementsystem kann als Promotor oder als Inhibitor der Tumorgenese dienen [7]. Während physiologische Konzentrationen von aktivierten Komplementmolekülen gegen den Tumor gerichtet sind, ist eine unbalancierte chronische Komplementaktivierung mit Tumorprogression assoziiert [50]. Bareke et al. sprechen von zwei verschiedenen Komplementzuständen. Das antitumorale Profil des Komplementsystems zeichnet sich gewöhnlich durch eine geringe Expression von Komplementinhibitoren, eine lytische MAC-Konzentration und moderate C5a-Konzentration aus. Dagegen ist das protumorale Profil meist durch eine hohe Konzentration von Komplementinhibitoren, die sublytische Konzentration an MAC und hohe C5a-Konzentration gekennzeichnet [7]. So nimmt die Regulation des Komplementsystems die Schlüsselrolle ein, die das Tumorwachstum durch Entzündungsregulation, T-Zellimmunität, Vaskularisation, Proliferation, Migration und die Invasivität des Tumors bestimmt [51]. Die Tumorzellen beeinflussen dieses physiologische Äquilibrium.

Anhand der veränderten Oberfläche sind Tumorzellen für das Immunsystem erkennbar. Dabei werden Epitope von mutierten Proteinen, die auch als Neoantigene bezeichnet werden, über MHC-I-Komplexe auf Zellmembranen präsentiert. Außerdem unterscheiden sich Tumorzellen durch die Peroxidation der Membranlipide als auch durch veränderte Muster der Glykosylierung von gesunden Zellen [51]. Die Initiatoren der Komplementkaskade sind bis heute noch rätselhaft. Die Komplementaktivierung als Reaktion auf natürliche IgM-Antikörper gegen Tumor-Antigene sowie die direkte Spaltung von C3 und C5 durch Tumorproteasen konnten jedenfalls nachgewiesen werden [50]. Zudem scheint der alternative Weg des Komplementsystems bei Tumoren, die durch die Virus-abhängige Transformation der Zellen entstanden sind, verstärkt aktivierbar zu sein [52].

### **2.4.3 Der MAC-Komplex im Bezug zum Tumor**

Der MAC-Komplex ändert die Permeabilität und Integrität von Membranen, das mitochondriale Transmembranpotential und damit verbunden die ATP-Produktion, das in die Zelllyse mündet [53]. Diesen Prozess bezeichnet man als Komplement-abhängige-Zytotoxizität (CDC). Allerdings wurde von vielen Autoren bereits bestätigt, dass der MAC-Komplex in sublytischen Mengen (sC5b-9), das Tumorwachstum fördern kann [45]. Er aktiviert Immunzellen zur Freisetzung von inflammatorischen Molekülen, erhöht die Resistenz gegenüber weiteren lytischen Attacken, erhöht die Zellproliferationsrate und erhöht die Resistenz gegenüber der Apoptose [45, 54]. In verschiedenen Studien werden mögliche Mechanismen vorgeschlagen, darunter gibt es die Stimulation des Zellzyklus über Mitogen-aktivierte Signalwege, oder über die Aktivierung der zyklinabhängigen Kinase 2 und 4 und damit verbunden die erleichterte Transition von der G1 zur S-Phase, oder durch die Transkription der Proto-Onkogene wie c-jun, junD und c-fos. Darüber hinaus soll er die Endothelzellen zur Freisetzung von bFGF und PDGF induzieren [54].

### **2.4.4 Das C5a in Bezug zum Tumor**

Das C5a ist eines der Komplementproteine und besteht aus 74 Aminosäuren und wird rapide durch Carboxypeptidasen zum C5a des-Arg metabolisiert [55]. Produziert wird das C5a systemisch via Komplementkaskade, aber auch lokal durch Thrombin oder Phagozyten, wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, und Tumorzellen. Das C5a hat zahlreiche Funktionen. Zum einen ist das C5a als Anaphylatoxin an der Induktion der Inflammation beteiligt, in dem es chemotaktisch auf inflammatorische Zellen wirkt, den respiratorischen Burst stimuliert, die Zytokin- und Chemokinfreisetzung stimuliert und die vaskuläre Permeabilität erhöht [55]. Weitere Funktionen sind die Stimulation der Angiogenese und des Fettsäuremetabolismus. Über

den Stoffwechselweg entstehen Eikosanoide, Leukotriene und Lipoxine, die auch als Regulatoren der Inflammation wirken. Beispielsweise beteiligen sich Eikosanoide bei der Chemotaxis und Leukozytenadhäsion. Unter den C5a-Rezeptoren sind bisher 2 Rezeptoren bekannt. Der bekannteste Rezeptor ist der C5aR1, auch CD88 genannt. CD88-Rezeptoren sind G-Proteingekoppelte Rezeptoren und befinden sich in Membranen von vielen verschiedenen Zelltypen. Bezüglich des Tumorwachstums gibt es zahlreiche Reviews, die über die protumorale Rolle des C5a berichten. Dennoch gibt es vereinzelt, aber nicht vernachlässigbare Studien, die dem C5a eine auch antitumorale Rolle zusprechen. Gunn et al. führen diese gegensätzlichen Beobachtungen auf die Konzentrationsabhängigkeit des Effektes des C5a auf das Tumorwachstum zurück [56]. Bei geringen C5a-Konzentrationen hemmt das C5a das Tumorwachstum. Ab einer unbekanntem Schwellenwert soll das C5a das Tumorwachstum fördern. Überdies kann womöglich C5a intrazellulär [44] direkt durch Tumorproteasen aus einer Spaltung von C5 gebildet werden. C5a kam gehäuft im Plasma der Patienten vor, die an NSCLC erkrankt sind [40]. Ähnlich war es bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom, Colonkarzinom und Ovarialkarzinom [51].

Hierbei dient das C5a der Invasion und Migration, dem Tumorwachstum durch Stimulation zur Produktion von Wachstumsfaktoren und Erhöhung der Aktivität der Mitogen-aktivierten Signalwege, Verhinderung der Apoptose, der Angiogenese und Suppression der antitumoralen Immunität [54]. Die erleichterte Invasion und Migration soll beispielsweise über die Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zur Degradation der extrazellulären Matrix [42], zelluläre Chemotaxis oder durch Verstärkung der IGF-Expression und damit verbunden durch die Senkung der E-Cadherinexpression, gelingen [54, 57]. Imamura et al. färbten immunhistochemisch die C5a-Rezeptoren der Zellen des Brusttumors ein und konnten zeigen, dass C5aR-positive Tumore größer waren und häufiger Lymphknotenmetastasen aufwiesen [58].

Die Apoptose wird beispielsweise verhindert durch Inhibition der Caspase-3 über ERK1/2 [54]. Es konnte bereits in einer Studie gezeigt werden, dass bei der C5-defizienten Maus die Kain-säure-induzierte Neurodegeneration erhöht war [54].

Die Erhöhung der Angiogenese unterliegt der erhöhten Produktion von VEGF. Es ist bereits eine starke Assoziation der altersabhängigen Makuladegeneration mit dem Mangel an Faktor H durch den Faktor H Polymorphismus Y402H bekannt. Bei diesen Patienten kommt es zur ungeeigneten choroidalen Neovaskularisation und somit zur vaskulären Invasion in die Retina. Sogenannte Drusen zählen als frühe Marker dieser Krankheit. Es wurde dabei entdeckt, dass diese Drusen eine erhöhte Konzentration an C3a und C5a aufweisen [54]. Und es wurde bereits nachgewiesen, dass C3a und C5a potenzielle Effekte auf die Makrophagen-vermittelte Angiogenese aufweisen [59]. Dabei befinden sich vor allem Rezeptoren für diese beiden Komplementproteine auf den sogenannten TAMs, den M2-Makrophagen [59].

Darüber hinaus wird die antitumorale Immunität supprimiert. Darunter ist bekannt, dass das C5a dem Recruitment von MDSC in die Tumormikroumgebung dient. Die MDSC wirken immunsuppressiv, in dem sie die antitumorale CD8<sup>+</sup>T-Zell-Antwort durch Produktion von RNS, ROS und Deprivation von Aminosäuren, supprimieren.

#### **2.4.5 Komplementregulatorproteine: Faktor H und das CD59**

Das Komplementsystem wird auf unterschiedlichen Stufen der Aktivierung durch Komplement-Kontroll-Proteine (CCP) reguliert. Diese Regulation dient dem Schutz von körpereigenen Zellen vor überhöhter Stimulation des Komplementsystems. Man unterscheidet dabei zwischen membrangebundenen- und löslichen Komplementinhibitoren. Im folgenden Abschnitt sollen die in diesem Projekt verwendeten Proteine vorgestellt werden.

Ein Vertreter der Plasmaproteine, die das Komplementsystem hemmen, ist Faktor H. Bekannt wurde er 1965 als  $\beta$ 1H-Globulin [60]. Er ist sowohl im Plasma mit einer Konzentration von 0,235–0,81 mg/ mL [61] als auch auf Zelloberflächen aufzufinden und wird konstitutiv in der Leber produziert. Jedoch wird Faktor H auch in Monozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und Oligodendrozyten gebildet [60]. Seine Synthese kann während der Inflammation mittels IFN- $\gamma$  hochreguliert werden [60].

Dabei handelt es sich um eine 155 kDa schwere Polypeptidkette [61], bestehend aus 20 sogenannten short consensus repeats (abgekürzt SCR) [62].

Es wird noch kontrovers diskutiert, in welchen SCR-Domänen die Bindungsstellen für C3b und Polyanione sind. Die Bindung der Polyanione wie Heparin, Sialinsäuren und Glykosaminoglykane sollen die Affinität zum C3b erhöhen [60]. Glykosaminoglykane sind stark in Basalmembranen und in der extrazellulären Matrix vertreten. Bekannt ist auch, dass Tumorzellen erhöht anionische Moleküle exhibieren. Es findet sich breite Zustimmung, dass die C-terminale Region entscheidend für den initialen Kontakt mit den Liganden ist [61]. Junnikkala geht davon aus, dass es drei C3b-Bindungsstellen und 2–3 Bindungsstellen für Polyanione gibt [63] und behauptet, dass sich die Bindungsstellen für Polyanione in den SCR-Domänen 7, 20 und möglicherweise nahe 13 befinden [64]. Buhé spricht von Bindungsstellen für das Heparin in SCR7, 13 und 19–20 und einer Bindungsstelle für Sialinsäuren in SCR16–20. Die Bindungsstellen für das C3b sollen sich in den SCR 1–4, 6–10 und 16–20 befinden [60]. Andere Autoren lokalisieren die C3b-Bindungsstelle in SCR 1–4, 12–14, 19–20 und die Bindungsstellen für das Heparin und Sialinsäuren in SCR7, 13 und 19–20 und die Bindungsstelle für CRP in SCR7 und heben hervor, dass durch Überlappung mancher Bindungsstellen eine kompetitive Hemmung nicht auszuschließen ist und die SCR-Domäne 19–20 entscheidend für seine Funktionalität ist [65].

Die Komplement-regulatorische Domäne ist in den N-terminalen SCR-Domänen 1–4 lokalisiert [61]. Das FH-Gen befindet sich auf Chromosom 1, 1q32, und ist im Gencluster für regulator of complement activation (RCA) lokalisiert [60]. Zur Faktor H-Familie gehören neben dem Faktor H, das Faktor H-ähnliche Protein 1 und FHR 1–5. Seine mRNA umfasst 4,4kb [63]. Durch das alternative Spleißen der Faktor H-mRNA entsteht neben Faktor H auch das Faktor H-ähnliche Protein 1 (FHL-1). Diesem 43 kDa schweren [60] Protein, das aus sieben N-terminalen SCRs von Faktor H und vier weiteren Aminosäuren besteht, wird auch die das Komplement hemmende Funktion wie Faktor H zugeschrieben [63]. Drei Funktionen des Faktors H mit Bezug zum Komplementsystem sind zurzeit bekannt. Zum einen verhindert Faktor H auf der Zelloberfläche die Bindung des Komplementfaktors B an C3b und somit die Bildung der membranständigen C3-Konvertase des alternativen Weges. Zum anderen fördert er die Dissoziation von C3bBb [63, 66]. Während die C3bBb Dissoziation durch Faktor H im Plasma schnell verläuft, soll sie auf Zelloberflächen stark von C3b abhängig sein [60]. Zudem agiert er als Cofaktor des Faktor I und ermöglicht die Inaktivierung des C3b zu iC3b [62].

Die Funktionen des Faktor H beschränken sich nicht nur auf das Komplementsystem, denn er bindet das Integrin CD11b/CD18, und beeinflusst die Zelladhäsion und aktiviert Neutrophile [67]. Er ist zudem Ligand für das L-Selektin. Außerdem wirkt er chemotaktisch auf Monozyten [67].

Die Rolle des Faktor H in der Regulation des Komplementsystems ist vor allem in der extrazellulären Matrix und in Basalmembranen bedeutend, da diese Strukturen intrinsisch keine anderen Komplementregulatorproteine exprimieren [68]. Deshalb sind bei Faktor H-Mutationen in erster Linie die Nieren und das Auge betroffen [68]. Bekannte Pathologien mit Assoziation zum Faktor H sind Nierenerkrankungen wie die membranoproliferative Glomerulonephritis Typ II oder das atypische hämolytisch-urämische Syndrom, die altersbedingte Makuladegeneration, Alzheimer, die rheumatoide Arthritis und maligne Neoplasien [60]. Darüber hinaus konnte bei verschiedenen mikrobiellen Pathogenen, wie die Gruppe A der Streptokokken, *Borrelia burgdorferi*, *Candida albicans*, *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus pyogenes* beobachtet werden, dass Faktor H auch zu deren Survival beiträgt [67].

Sowohl der Komplementfaktor H als auch das Faktor H-ähnliche Protein 1 beeinflussen womöglich die Immune escape von Tumorzellen in Kolon- [69], Lungen- [70], Ovarial- [63] und Harnblasen-[71], in kutanen Plattenepithelkarzinomen [66] und in Glioblastomen [64].

Junnikkala konnte mittels ELISA Faktor H und das Faktor H-ähnliche Protein in der Aszitesflüssigkeit von Patienten mit Ovarialkarzinom nachweisen. Des Weiteren konnte er mithilfe von immunhistochemischen Analysen an Kryostatschnitten des Ovarialtumors Faktor H und das Faktor H-ähnliche Protein 1 in-vivo nachweisen. Dabei stellte er fest, dass Faktor H zum

größten Teil in der apikalen Schicht verteilt war. Allerdings war er auch gering in der extrazellulären Matrix vorhanden. Außerdem zeigte er mittels PCR-Analysen die Produktion von FH-mRNA und FHL-1-mRNA und mittels Immunoblots die Produktion von Faktor H und dem FHL-1 durch Tumorzelllinien aus dem Ovar. Neben dem Ovarialkarzinom gelang der Nachweis von Faktor H auch in Glioblastomzelllinien. Ajona konnte zeigen, dass Lungentumorzelllinien Faktor H und zu einem geringeren Maß auch FHL-1 sezernieren und in-vitro resistent gegenüber der CDC sind [60]. Wilczek konnte mittels Immunhistochemie von Biopsaten aus colorektalen Tumoren FH und FHL-1 nachweisen [69]. Cheng detektierte FH und FHL-1 in biologischen Flüssigkeiten von Blasenkrebspatienten und schlägt ihn als möglichen Biomarker vor [71]. Hörl konnte die Anfälligkeit der Tumorzelle gegenüber der CDC durch Ofatumumab bei Leukämiezelllinien verstärken bzw. wiederherstellen, in dem er die Faktor H-Bindung mittels rekombinant hergestellten hSCR18–20 hemmte [61].

Das CD59, das Protectin, ist ein GPI-verankertes 18–20 kDa schweres [72] Membranprotein, das zur Ly6-Superfamilie gezählt wird [73]. Das CD59 wurde an vielfältigen Körperstellen wie beispielsweise auf Erythrozyten, Monozyten, im Herz, in der Milz, in der Leber und in den Nieren entdeckt [52]. Das CD59 Gen ist auf Chromosom 11p13 lokalisiert [74].

Drei Funktionen werden beschrieben. Es hemmt die Bindung des C9 an C5–8 [72] und verhindert somit die Formation des MAC-Komplexes, sodass möglicherweise Tumorzellen vor der komplementabhängigen Toxizität (CDC) geschützt werden [39]. Außerdem ist es ein sekundärer Signalstimulant, indem es die Aktivierung der T-Lymphozyten induziert. Des Weiteren interagiert es mit CD2 bei der Modulation der T-Zelladhäsion [73]. Die Regulation der Expression von CD59 ist stark umstritten.

Bekannt ist das CD59 auch dadurch, weil Patienten mit Mangel an Glykosylphosphatidylinositol (GPI), das als Anker für das CD59 dient, von der sogenannten paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie betroffen sind. Dabei handelt es sich um eine Komplement-medierte Lyse von Erythrozyten. Vor kurzer Zeit wurde zudem die Beteiligung des Mangelzustands an CD59 an der Pathogenese von Diabetes [72] und Multipler Sklerose [52] entdeckt. Eine Überproduktion an CD59 ist auch mit Krankheiten wie Alzheimer, die ulzerative Colitis oder rheumatoide Arthritis assoziiert [75]. Erhöhte Konzentration des CD59 ist bereits auch bei vielen Arten von Tumorgewebe nachgewiesen. Tumorzellen des Pankreastumors sollen durch Hochregulation von CD59 vor CDC geschützt werden [76]. Erhöhtes Vorkommen sah man auch bei NHL oder CLL [77]. Es wurde bereits ein anti-hCD59-Inhibitor, der als rILYd4 definiert ist, entwickelt [77]. Dieser Inhibitor hebt die Funktion des CD59 sowohl in normalen als auch in B-Lymphomzellen auf und stellt die Sensitivität gegenüber der CDC wieder her [77]. Im Oesophaguskarzinom war

es stark sowohl im Tumor als auch im Stroma vertreten [78]. Allerdings konnte keine Korrelation zwischen der Färbungsintensität und dem TNM-Stadium oder histologischen Grad erkannt werden. Außerdem wurde beobachtet, dass das CD59 die Sensitivität gegenüber der Radiotherapie beim Oesophaguskarzinom negativ beeinflusst. Das Overall Survival war bei Patienten verringert, die eine Strahlentherapie erhielten und bei denen eine erhöhte CD59-Expression nachgewiesen wurde [79]. Auch bei der immunhistochemischen Analyse der Expression von CD59 von Tumorgewebe des Colons konnte ein erhöhtes Auftreten festgestellt werden, das mit dem Differenzierungsgrad und dem TNM-Stadium korrelierte. Allerdings konnte keine Korrelation mit dem Alter oder Geschlecht erkannt werden [80].

Ravindranath zeigte eine erhöhte Expression von CD59 in Biopsaten aus Kopf-Hals-Karzinomen als in nicht-neoplastischen Plattenepithelzellen [81]. Dabei waren das Zytoplasma und die Zellmembran von malignen Zellen stärker gefärbt. Im Bindegewebe, wie das Stroma der Submukosa oder die Lamina propria, fehlte es gänzlich.

## 2.5 Tumor Microenvironment

In den letzten Jahren hat man herausgefunden, dass die Tumormikroumgebung (tumor microenvironment, TME) ebenso wichtig für die Karzinogenese ist. Es besteht aus Stromazellen, Immunzellen, Tumorzellen und einer extrazellulären Komponente. Vorteil der nicht malignen Zellen der Tumormikroumgebung im Vergleich zu Tumorzellen ist die genetische Stabilität. Kopf-Hals-Tumore weisen im Allgemeinen viel Immuninfiltrat auf [25]. Allerdings wurde bereits beobachtet, dass sich Tumore mit HPV-Assoziation durch eine noch höhere Immuninfiltration auszeichnen und werden deshalb von vielen Autoren als heiße Tumore bezeichnet [25]. Möglicherweise ist die stärkere Immuninfiltration Folge der Immunantwort auf virale Antigene [25]. Mit diesem Unterschied könnte auch das verbesserte Therapieansprechen von HPV-positiven Patienten auf die Chemotherapie oder Strahlentherapie zusammenhängen [25].

### 2.5.1 Lymphozyten

Die Gruppe wird von T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen gebildet.

Die T-Zellen können nach ihrem sogenannten „Cluster of Differentiation“ in CD4+ und CD8+ T-Zellen unterteilt werden. Allgemein ist häufiger Marker für T-Zellen das CD3. CD4+ T-Zellen sind sowohl bei der humoralen als auch bei der zellulären Immunabwehr beteiligt [25]. Die antitumorale Antwort von CD4+ T-Zellen wird von Zytokinen, im Speziellen durch Interferon- $\gamma$  und durch den Tumornekrosefaktor, beeinflusst [25]. Erstaunlicherweise produzieren diese Zellen auch das Interferon- $\gamma$  [25]. In verschiedenen Studien konnte eine erhöhte Infiltration der HPV-positiven Tumore mit CD4+ T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumoren beobachtet werden [25]. Ob CD4+ T-Zellen das Outcome positiv oder negativ beeinflusst, wird heute noch kontrovers diskutiert [82]. CD8+ T-Zellen zerstören Tumorzellen durch Ausschüttung von proinflammatorischen Effektormolekülen wie Interferon- $\gamma$ , TNF, Granzyme A und B, und Perforin. Auch hier konnte ein gesteigertes Vorkommen bei HPV-positiven Tumoren beobachtet werden, das mit einem besseren Gesamtüberleben korrelierte [25]. Es wird diskutiert, ob das bessere Outcome der HPV-positiven Patienten mit dem erhöhten T-Zell-Infiltrat im TME zusammenhängt. In der Studie von King et al., bei der das 3-Jahres-Überleben von Patienten mit Oropharynx-tumor abhängig vom Level der T-Zell-Infiltration evaluiert wurde, konnte festgestellt werden, dass das Survival mit steigender T-Zell-Infiltration zunahm [25].

Besondere Subgruppe der CD4+T-Zellen bilden die regulatorischen T-Zellen (Tregs) [82]. Häufig verwendeter Marker für Tregs ist das FoxP3. Die regulatorischen T-Zellen (Tregs) werden als starke Suppressoren der antitumoralen Immunität angesehen [45]. Sie hemmen die T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion [25] und sezernieren immunsuppressive Zytokine

wie IL-10 oder den Transforming growth factor (TGF) [45]. Außerdem ist das C5a bei der Rekrutierung von Tregs beteiligt [45]. Allerdings deuten viele Studien darauf hin, dass die regulatorischen T-Zellen, anders als erwartet, bei vielen Tumorarten, unter anderem beim Kolorektalkarzinom, Lymphomen und bei Kopf-Hals-Karzinomen, mit einem besseren Überleben verbunden sind [25]. Die Abhängigkeit des HPV-Status mit der Infiltration durch Tregs wird noch diskutiert [25]. Manche Studien weisen darauf hin, dass der Quotient aus der Anzahl von Tregs und den CD8+ T-Zellen aussagekräftiger zur Beurteilung des Outcomes ist als die absolute Zahl der Tregs [28].

Die B-Zellen, deren häufiger Marker das CD20 ist, gehören zur humoralen Immunantwort. Zu diesem Gebiet liegen allerdings bezüglich der Kopf-Hals-Tumore sehr wenige Studien vor [25]. Pretscher et al. konnten zeigen, dass CD20+ B-Zellen vermehrt in Metastasen als im Primärtumor vorkommen und, dass die erhöhte Zahl der CD20+ B-Zellen in Lymphknotenmetastasen mit einem besseren Outcome bei Patienten mit einem Oropharynxkarzinom assoziiert ist [83]. Als Subtyp wurden auch regulatorische B-Zellen (Bregs) identifiziert, die die Aktivität von verschiedenen Immunzellen über Zytokine beeinflussen [34]. Dabei wurden sie vermehrt in metastasierten Lymphknoten von Melanomen, Magen, Kolon- und Zervixkarzinomen entdeckt [34].

Erhöhte Konzentrationen an NK-Zellen konnten bei HPV-positiven Oropharynxtumoren festgestellt werden, das auch mit einem besseren Outcome assoziiert war [25].

### **2.5.2 Myeloische Zellen**

Die myeloischen Zellen werden von Zellen des blutbildenden Systems gebildet, die nicht dem lymphatischen System zugeordnet werden. Aus den myeloischen Vorläuferzellen entwickeln sich Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Viele Studien belegen einen Einfluss von Vertretern dieser Gruppe auf die Tumormikroumgebung. Beispielsweise ist bekannt, dass dendritische Zellen (DCs), die die Funktion und Differenzierung von T-Zellen beeinflussen, sowohl das Tumorstadium hemmen als auch fördern können. Bei HPV-positiven Tumoren ist eventuell die Anzahl an dendritischen Zellen erhöht, das mit einer erhöhten Anzahl an TILs korreliert [25].

Darüber hinaus rücken die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) immer mehr in den Vordergrund. Die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) entstehen in soliden Tumoren meist aus den im Blut zirkulierenden Monozyten [84]. Je nach ihrem Polarisationsstatus können sie in den M1 oder M2- Subtyp kategorisiert werden [84]. Die M1-Makrophagen können durch Th1-Zytokine wie Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  [59] aktiviert werden. Die M2-Makrophagen werden durch Th2- Zytokine wie z.B. IL-4, IL-10 oder IL-13, aktiviert [84]. Dabei ist die Polarisation

reversibel und stark abhängig von der Tumormikroumgebung [84]. Die M1-Makrophagen werden als tumorizid und die M2-Makrophagen als tumorfördernde Makrophagen angesehen [84]. Demzufolge werden dem M1-Phänotyp antiangiogenetische und proinflammatorische Funktionen zugeschrieben. Wichtige von ihm sezernierte Signalmoleküle sind das ROS, RNS, IL-6, IL-12, sVEGF-R1, TNF- $\alpha$ . Der M2-Phänotyp sezerniert IL-10, VEGF, IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ . Er ist angiogenetisch und antiinflammatorisch [59]. Die M2-Makrophagen produzieren Zytokine und Chemokine, die die EMT-Transition und somit den ersten Schritt zur Tumordinvasion, stimulieren [85]. Daneben spielen TAMs auch eine Rolle bei der Zellmigration und Dissemination [85]. Der M2-Phänotyp kann über das C3a und C5a beeinflusst werden [59]. Die TAMs können über den PTX<sub>3</sub>-Mangel und das Komplementsystem aktiviert werden. Das Pentraxin 3 wird als Akute-Phase-Protein bei der Inflammation von verschiedenen Zellen, unter anderem von Makrophagen, Neutrophilen und Endothelzellen, ausgeschüttet und moduliert den Entzündungsprozess [86]. Der PTX<sub>3</sub>-Mangel, der Faktor H abhängig ist, führt über die Komplementaktivierung möglicherweise zur erhöhten Konzentration von VEGF und wirkt sich deshalb günstig auf das Tumorstadium aus [85, 87]. Bei HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren konnte eine erhöhte M1/M2-Ratio beobachtet werden, die möglicherweise das verbesserte Survival gegenüber den HPV-negativen Tumoren erklären könnte [25].

Ein weiterer Vertreter der myeloischen Gruppe bilden die myeloischen Suppressorzellen (MDSCs). Die MDSCs umfassen eine heterogene Population von Zellen myeloischen Ursprungs [84]. Sie umfassen myeloische Progenitorzellen, unreife Makrophagen, unreife Granulozyten und unreife dendritische Zellen [84]. Sie unterdrücken die T-Zell-Antwort und können zu TAMs differenzieren [84]. Studien belegen, dass MDSCs eine starke Expression von C5a-Rezeptoren aufweisen, so dass sie möglicherweise stark von C5a beeinflusst werden [88]. Außerdem ist bekannt, dass das C5a zum Recruitment von MDSCs beiträgt [45].

Zuletzt sind Tumor-assoziierte neutrophile Granulozyten (TANs) noch zu erwähnen. Die Komplementaktivierung führt auch über das C5a zur Stimulation der epithelialen und endothelialen Zellen zur Freisetzung von Leukotrien B<sub>4</sub>. Das bewirkt das TAN-Recruitment und die Entstehung von N2-Typ-TANs, dass das Tumorstadium und die Metastasierung begünstigt werden [39].

### 2.5.3 Stromazellen

Auch die Funktion der Stromazellen in der Tumormikroumgebung ist von Relevanz. Ein erhöhtes Vorkommen von Cancer-associated fibroblasts (CAF) sind beim Mammakarzinom, Lungenkarzinom und beim Pankreaskarzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert [84]. Sie stammen meist aus lokalen Fibroblasten, selten aber auch aus mesenchymalen Stammzellen

des Knochenmarks oder auch über die sogenannte epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) aus lokalen Epithelzellen [84]. Sie beteiligen sich am Remodeling der extrazellulären Matrix über die Synthese von zahlreichen Komponenten der extrazellulären Matrix und beeinflussen über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen das Tumorwachstum, die Angiogenese und Metastasierung [84, 89, 90].

Die Tumor-associated endothelial cells (TECs) bilden die innere Zellschicht von Blutgefäßen in Tumoren und unterscheiden sich von gesunden Endothelzellen durch die erhöhte Expression von proangiogenetischen Faktoren, die strukturelle Abnormalität und damit verbunden die erniedrigte Barrierefunktion [84, 91]. Infolgedessen modulieren TECs auch das Recruitment von Immunzellen und beeinflussen die Tumorangiogenese maßgeblich [84].

## 2.6 Immuntherapie

Mit der Verwendung von Immuntherapeutika wird die Verstärkung der körpereigenen Abwehr gegen den Tumor beabsichtigt. Zur Deeskalationstherapie wird vor allem bei HPV-positiven Oropharynxkarzinomen nach möglichen effektiven Immuntherapeutika gesucht. Lechner betont, dass mehr als 80 % der Primärtumore bei HPV-positiven Oropharynxkarzinomen durch Chemoradiotherapie eliminiert werden können und die Herausforderung darin besteht, die restlichen 20 %, bei denen die 2-Jahres-Überlebensrate bei 40 % liegt, zu identifizieren und effektiv zu therapieren [92].

Unter der Immuntherapie gibt es die Therapie mit monoklonalen Antikörpern, die auf die sogenannten Checkpoints oder direkt auf Tumorzellen gerichtet sind, die Therapie mit onkolytischen Viren, die Immunzell-basierte Therapie, die therapeutische Impfung, Zytokintherapien und die Toll-like-Rezeptor Stimulation [23, 93].

### 2.6.1 Monoklonale Antikörper

Die monoklonalen Antikörper sind entweder gegen Immun-Checkpoints oder gegen Tumorantigene gerichtet. Eine Grundlage zum Verständnis des Wirkmechanismus der Antikörpertherapie bildet die Kenntnis über den Aufbau des Antikörpers. Der Antikörper setzt sich aus zwei Domänen zusammen. Das Fab-Fragment dient der Erkennung und Bindung von Antigenen auf Tumorzellen. Das Fc-Fragment triggert die proinflammatorische Antwort durch das Komplementsystem oder Effektorzellen [88]. Unter den Mechanismen der Tumorzellbekämpfung sind die ADCC (Antikörper-abhängige zellvermittelte Toxizität), CDC (Komplementabhängige Toxizität) und CDCC (Komplementabhängige zellvermittelte Toxizität) zu unterscheiden. Die CDC gelingt durch Tumorzellerkennung über mindestens 2 IgGs, die maximal 30–40 nm voneinander entfernt sind, oder 1 IgM [40]. Die Komplementaktivierung führt hierbei über Aktivierung des klassischen Weges mittels C1q-Bindung an der Fc-Region des Antikörpers zur Bildung des MAC-Komplexes [42]. Neben der CDC, dem direkten zytotoxischen Effekt des Komplementsystems, ist auch die Opsonierung und Rekrutierung von Immunzellen zur Elimination von Pathogenen von Bedeutung [42]. C3 Fragmente (iC3b/C3d) werden vom Komplementrezeptor 3 (CR3, CD11b/CD18) auf Effektorzellen wie NK-Zellen, Makrophagen oder Neutrophilen erkannt, das die CDCC ermöglicht [42]. Bei der ADCC bindet ein Antikörper die Tumorzelle. Die Effektorzelle erkennt den Antikörper über dessen Fc-Rezeptor [53]. Mögliche Effektorzellen sind die NK-Zelle, Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Die Effektorzelle schüttet Interferon- $\gamma$  und zytotoxische Proteine, wie Perforine oder Granzyme, aus. Infolgedessen wird die Apoptose der Zelle eingeleitet [94].

Die ADCC, CDCC und CDC dürfen nicht als separate Mechanismen betrachtet werden. Sie beeinflussen sich gegenseitig [42]. Die Komplementaktivierung in der Tumormikroumgebung ist deshalb ein fundamentaler Mechanismus der Immuntherapie, die maßgebend für den Therapieerfolg ist [88].

Bei Kopf-Hals-Karzinomen gewinnt die Immuncheckpoint-Therapie, immer mehr an Bedeutung. Die monoklonalen Antikörper können die Checkpoint-Moleküle entweder stimulieren oder blockieren [23]. Beispielsweise sind die anti-PD-1/PD-L1-Antikörper, Nivolumab und Pembrolizumab, von der FDA zur Therapie von metastasierten, Cis-Platin-refraktären Kopf-Hals-Karzinomen unabhängig vom HPV-Status zugelassen [92].

Das sogenannte „programmed cell death protein 1 (PD-1)“ ist ein Rezeptor auf Immunzellen, wie T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen sowie auf myeloischen Zellen, der bei Aktivierung durch die Wechselwirkung mit dem „programmed cell death-ligand 1 (PD-L1)“ ihre Immunantwort hemmt. Das PD-L1 wird von antigenpräsentierenden Zellen und von Tumorzellen exprimiert [95]. Die Inhibition der PD1-PD-L1-Interaktion ermöglicht folglich wieder die T-Zell-Funktion [96]. Die bisherigen klinischen Studien zeigen kaum Unterschiede im Outcome zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren, bei denen der Checkpointinhibitor gegen PD1/PD-L1 eingesetzt wurde [3]. In einer Phase-3-Studie, CHECKMATE-141, war die 1-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, bei denen es nach einer platin-basierten Therapie zu einem Rezidiv gekommen war, durch Nivolumab im Vergleich zur Standardtherapie (Methotrexat, Docetaxel oder Cetuximab) erhöht. Sie lag bei der Therapie mit Nivolumab bei 36 %, und bei der Standardtherapie bei 16 % [28]. Dennoch ist die Therapieantwort von Immuntherapeutika unzureichend [88]. Zahlreiche Studien versuchen, die Resistenzmechanismen gegen die Immuntherapeutika zu bestimmen. Zha et al. konnten die Komplementaktivierung bei der anti-PD-L1-Therapie nachweisen, das mit einer massiven Erhöhung der C5a-Konzentration verbunden war. Außerdem gelang ihnen die Steigerung des Therapieeffekts der Immuncheckpointblockade durch die kombinierte Inhibition des C5a-Rezeptors in Melanom-Mausmodellen. Die Immuncheckpointblockade führt zur Aktivierung des Komplementsystems, demzufolge zur Generierung von C5a. Das C5a erhöht das Recruitment von MDSCs, die den Effekt der Immuncheckpoint-Blockade verringern [88]. Auch Ajona et al. gelang eine vergleichbare Demonstration anhand von Mausmodellen, in denen Lungentumorzellen injiziert wurden [97]. Die Kombinationstherapie reduzierte das Tumorwachstum, die Metastasierungsrate und verbesserte das Survival.

Die monoklonalen Antikörper können auch direkt gegen Tumorantigene gerichtet sein. Bei den Tumorantigenen unterscheidet man zwischen tumorspezifischen Antigenen (TSA) und tumor-

assoziierten Antigenen (TAA). Während tumorspezifische Antigene ausschließlich von Tumorzellen produziert werden, werden tumor-assoziierte Antigene auch in geringer Menge von gesunden Zellen exprimiert [23]. Ein bekannter Vertreter für die tumor-assoziierten Antigene bei Kopf-Hals-Karzinomen ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR). Cetuximab, der gegen den EGFR gerichtet ist, ist zur Behandlung von verschiedenen Tumorentitäten, wie das kolorektale Karzinom, Kopf-Hals-Tumoren und das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom, in Gebrauch [98]. Viele Studien überprüfen die Wirksamkeit monoklonaler Antikörper gegen Onkoproteine des HPV, wie beispielsweise das E6 oder E7. In zahlreichen Tierversuchen konnte eine Hemmung des Tumorwachstums festgestellt werden. Sie sind allerdings nicht vielversprechend, da die monoklonalen Antikörper aufgrund ihrer Größe nicht in die intrazellulären Regionen, vor allem intranukleär, zur Bindung der HPV-Onkoproteine gelangen können [93]. Bezüglich des Mechanismus wird diskutiert, ob die Hemmung des Tumorwachstums über anti-HPV E6 und anti-HPV E7 über die Nekrose (ADCC) gelingt oder, ob andere Mechanismen über das Komplementsystem (CDC) oder über Lymphozyten (CDCC) das Tumorwachstum hemmen [93]. Zur Steigerung der Therapieantwort wurden radiomarkierte monoklonale Antikörper, „Affitoxine“, intrazelluläre single-chain antibodies (scFvs) und nanobodies entwickelt. Die radiomarkierten monoklonalen Antikörper zielen auch auf die oben genannten Onkoproteine E6 und E7 und haben sich als potenzielle Therapeutika gegen HPV-positive Tumore in Tierversuchen herausgestellt. Sie binden das extrazelluläre E6 oder E7 und zerstören Tumorzellen über zytotoxische Radiation des Areal. Auch die sogenannten Affibodies, die auf Onkoproteine abzielen, rücken mehr in den Vordergrund. Die Affibodies sind durch Proteinengineering hergestellte Eiweiße, die eine hohe Affinität zu spezifischen Proteinen besitzen und mit einem Exotoxin verbunden sind. Die intrazellulären Single-Chain Antibodies (scFvs) sind künstlich hergestellte Antikörperfragmente. Anders als die oben genannten monoklonalen Antikörper sind sie in der Lage, die Zellmembran zu passieren und intrazelluläre Onkoproteine zu binden. Der antitumorale Effekt konnte bereits bei den Zielproteinen FGFR und FGF-1 sowohl in-vitro als auch in-vivo nachgewiesen werden. Die Nanobodies unterscheiden sich von den scFvs durch die Abwesenheit von leichten Ketten. Auch sie stellen einen vielversprechenden Ansatz dar. Es konnten bereits Nanobodies hergestellt werden, die gegen das L1-Protein des HPV zielen [93].

### **2.6.2 Onkolytische Viren**

Onkolytische Viren wirken über zwei Mechanismen. Zum einen infizieren und lysieren sie die Tumorzelle. Zum anderen stimulieren sie die systemische antitumorale Immunantwort über Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), Schaden-assoziierte molekulare Muster

(DAMPs) oder Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) [23, 99]. Die Injektion in den Patienten kann sowohl intratumoral als auch intravenös erfolgen. Zurzeit werden Studien im Bereich des Kopf-Hals-Karzinoms (Phase III, pelareorep, Reolysin in Kombination mit Chemotherapie, NCT01166542) durchgeführt. Darüber hinaus ist das sogenannte Oncorine (H101), ein onkolytisches Adenovirus, zur Behandlung des Nasopharynxkarzinoms in Kombination mit der Chemotherapie (5-Fluorouracil und Cis-Platin) in China seit 2005 zugelassen [99].

### **2.6.3 Immunzell-basierte Therapie (Adoptiver Zelltransfer)**

Bei der adoptiven Zelltherapie werden körpereigene Lymphozyten, meist T-Zellen, dem Patienten entnommen und nach der Manipulation, Selektion und Expansion ex-vivo wieder dem Körper zugeführt. Der Vorteil der adoptiven Zelltherapie besteht in der Vermehrung von T-Lymphozyten außerhalb des immunsuppressiven Milieus [23].

Man unterscheidet zwischen der Therapie mit Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL-Therapie) und den weiteren Generationen der Immunzell-basierten Therapie, der Therapie mit T-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren (CAR-T-Zell-Therapie) und der Therapie mit T-Zell-Rezeptor-modifizierten T-Zellen (TCR-T-Therapie).

Die TIL-Therapie umfasst die Entnahme von T-Zellen aus dem resezierten Tumorgewebe, die Expansion der heterogenen polyspezifischen Lymphozytenpopulation ex-vivo und die Reinfusion der Lymphozyten in den Patienten [28]. Diese Therapieform zeigte bemerkenswerte Regression in Patienten mit metastasiertem HPV-positiven Zervixkarzinom [93]. Eine Phase 2-Studie zeigte, dass sie bei HPV-assoziierten Tumoren, darunter vertreten das Zervixkarzinom, Oropharynxkarzinom und das Analkarzinom, das Tumorwachstum hemmen kann [93].

Die CAR-T-Zelltherapie dient der Erkennung von Antigenen unabhängig von deren Präsentation auf MHC-Molekülen, da, wie beispielsweise bei HPV-assoziierten Tumoren, oft der Mechanismus der Antigenpräsentation gestört ist. Dabei werden die aus einer Apherese gewonnenen T-Zellen gentechnisch verändert, dass sie synthetische chimäre Antigenrezeptoren bilden. Sie werden ex-vivo amplifiziert und anschließend in den Patienten infundiert [99, 100]. Bei der TCR-T-Therapie werden T-Zellen gentechnisch ex-vivo verändert, dass sie gezielt mit hoher Affinität Tumorantigene, wie zum Beispiel das E7-Protein, erkennen. Anders als bei der CAR-T-Zelltherapie werden intakte T-Zellrezeptoren, die modifiziert werden, verwendet.

### **2.6.4 Therapeutische Impfung**

Zu guter Letzt sind die therapeutischen Impfstoffe zu erwähnen. Die therapeutischen Impfstoffe dienen nicht der Prävention von Krankheiten, sondern sind dazu bestimmt, bereits existierende Erreger oder Krebszellen zu bekämpfen. Bei der therapeutischen Impfung werden körpereigene

Immunzellen mit Tumorantigenen konfrontiert und zur Elimination der Tumorzellen aktiviert. Als Vektor werden Bakterien, Viren, Peptide, Nukleinsäuren und Zellen, typischerweise die dendritischen Zellen und Tumorzellen, verwendet [93]. Eine Hürde bildet das immunsuppressive Tumormilieu mit Tregs, TAMs und MDSCs, die die Vermehrung von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen verhindert. Daher wird versucht, mit multiplen Impflokalisationen und mittels Kombination mit weiteren Immuntherapeutika, das Therapieansprechen zu erhöhen. Bisher zeigen sie keinen therapeutischen Erfolg bei Verwendung zur Bekämpfung des Zervixkarzinoms [92]. Bezüglich der Verwendung beim HPV-positiven Oropharynxkarzinom laufen aktuell zahlreiche Studien [92]. Beispielsweise liefert eine Studie mit MEDI0457 vielversprechende Ergebnisse. MEDI0457 ist eine Kombination aus zwei DNA-Plasmiden, das für die Antigene E6, E7 und IL-12 codiert und intramuskulär mit Elektroporation injiziert wird [92]. Ergebnisse der Studie zeigten bei 18 von 21 Patienten, bei denen ein Oropharynxkarzinom festgestellt wurde, erhöhte Aktivität der HPV-Antigen-spezifischen T-Lymphozyten im peripheren Blut [101].

### **3 Material und Methoden**

Zur Untersuchung der Fragestellung wurden Tumorpräparate des Kopf-Hals-Bereichs durch das Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz angefärbt. Dabei wurde die Tissue Microarray-Technik in Kombination mit der Immunhistochemie verwendet.

#### **3.1 Patientenkollektiv**

Eingeschlossen wurden Patienten, bei denen in der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum 2008–2020 das Oropharynxkarzinom diagnostiziert wurde.

Die Patientendaten wurden von A. Beltz zur Verfügung gestellt und durch eigene Arbeiten ergänzt. Die Datentabelle umfasste das Geschlecht, das Geburts- und, falls vorhanden, das Todesdatum, das Datum der Erstdiagnose, das Datum des letzten Kontakts, das Rezidivdatum, den Alkohol- und Zigarettenkonsum, auch hinsichtlich der Quantität, die Lymphknoten-Ratio, den HPV-Status, das Vorhandensein eines extranodalen Wachstums bei Lymphknotenmetastasen, das histologische Grading, den TNM-Status und die UICC-Kategorie. Sowohl der TNM-Status als auch die UICC-Klassifikation basierten auf der veralteten 7. Auflage. Darüber hinaus gab es vereinzelt auch Daten bezüglich des L-, V-, Pn-Status.

Das mittlere Alter des Gesamtkollektivs zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Oropharynxtumors betrug 61 Jahre, bei einer Skala von 44–84 Jahren. Von den 164 Patienten waren 119 männlich und 45 weiblich. Das mittlere Follow-up betrug 52 Monate bei einer Skala von 1–148 Monaten.

Ethikkommission: Die Gewebeerwendung zu Forschungszwecken wurde von der Ärztekammer Rheinhessen genehmigt. Die Patienten stimmten der Gewebeerwendung im Rahmen der Biobank-Vereinbarung der Universitätsmedizin Mainz zu.

### **3.2 Herstellung der TMAs**

Zuallererst wurden alle vorhandenen HE-Schnitte vom Kollektiv auf das Vorhandensein von Tumorgewebe mithilfe eines Mikroskops überprüft und markiert. Außerdem wurden das peritumorale Gewebe und, falls auch vorhanden, befallenes Lymphknotengewebe markiert. Mittels dieser Anzeichnungen konnten Tumorareale auf den dazugehörigen Paraffinblöcken lokalisiert werden.

Die Herstellung der TMAs geschah mittels TMArrayer™. Es wurde ein Abstand von jeweils 1,6 mm zu jeder Stanze mit einer Dicke von 1 mm gewählt. Zur Verbindung der einzelnen Stanzen mit dem gestanzten leeren Paraffinblock wurde dieser nach manueller Einbringung der Stanzen über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert. Danach folgte die Abkühlung bei Raumtemperatur und durch Lagerung im Kühlschrank bei 4°C. Mittels dem Rotationsmikrotom Hyrax M55 (Zeiss) wurden Schnitte mit einer Dicke von 3 µm angefertigt und auf den Objektträger gebracht. Dann wurden die Schnitte zur besseren Haftung auf dem Objektträger auf eine Strickplatte (Medite OTS40) bei 45°C gebracht, sodass sich gleichzeitig die Falten entfernen konnten.

### 3.3 Immunhistochemische Färbung der TMAs

Mittels Immunhistochemie wurde die Expression von fünf verschiedenen Proteinen überprüft. Darunter der Faktor H, Faktor I, das SUSD4, CD59 und C5a.

Vor der Färbung wurden die formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte einer Entparaffinierung und Rehydrierung, gefolgt von hitzeinduzierter Epitopemaskierung mit der auf dem Datasheet des primären Antikörpers angegebenen Demaskierungsmethode, unterzogen.

Die Entparaffinierung der einzelnen TMAs erfolgte zunächst 15 min lang bei 66°C im Brutschrank, danach 2\*10 min lang in Xylol. Zur Rehydrierung wurden die Schnitte jeweils für 2 min in eine Alkoholreihe in absteigender Konzentration, beginnend von 100 %, 96 %, 70 % und 50 % inkubiert. Zuletzt wurden sie in destilliertes Wasser für 1 min getaucht.

Die Demaskierung der Antigene, das Antigen-Retrieval, gelang mittels Inkubation der Schnitte im pH 9 EDTA-Puffer für 20 min oder pH 6 Citrat-Puffer für 35 min im erwärmten Dampfgerar bei 96°C. Die Abkühlung der Schnitte in der Pufferlösung erfolgte dann im Wasserbad.

Anschließend wurden die Schnitte zur Auflösung der Oberflächenspannung mit einem Wash Buffer behandelt.

Zur Färbung verwendete man den Autostainer nach dem EnVision™FLEX+system (Code K8002). Alle Schnitte wurden zunächst jeweils für 5 min mit Flex Block (Dako EnVision™Flex/Peroxidase-Blocking Reagent) zur Blockierung der endogenen Peroxidase behandelt. Dadurch wurde die unspezifische Hintergrundfärbung vermindert. Danach erfolgte die Färbung mit den unten aufgeführten Antikörpern jeweils für 30 min. Zuvor wurden diese Antikörper entsprechend den zur immunhistochemischen Färbung empfohlenen Konzentrationen mit dem Diluent verdünnt. In Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper wurde dann wahlweise für 15 min Rabbit15 (EnVision™Flex+ Rabbit (Linker)) oder Mouse 15 (EnVision™Flex + Mouse (Linker)) zur Verstärkung des Signals von primären Maus- bzw. Kaninchen-Antikörpern eingesetzt. Das tertiäre Reagent, FlexEnvHRP20 (DakoEnVision™Flex/ HRP Detection Reagent) wurde für 20 min appliziert. Es besteht aus Dextran-Backbone, an das viele Peroxidase (HRP)-Moleküle und Moleküle sekundärer Antikörper gekoppelt sind. Danach wurde FlexDAB für 5 min angewandt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Das Substratsystem besteht aus zwei Komponenten, dem EnVision™Flex DAB + Chromogen und dem wasserstoffperoxidhaltigen EnVision™Flex Substrate Buffer, das zur Verdünnung des ersteren dient. Dieses Substratsystem führt zum kontrastreichen, braunen Endprodukt am Ort des Ziel-Antigens.

Zuletzt wurden alle Schnitte mit EnvHema (EnVision™Flex Hematoxylin) 5 min lang zur Gegenfärbung behandelt, sodass eine deutliche Blaufärbung der Zellkerne erzielt werden konnte.

## Material und Methoden

Nach der Färbung wurden die Objektträger in Leitungswasser gebracht, das eine Farbverstärkung zur Folge hatte. Eine weitere Intensivierung der Farbe wurde mittels Hämalaun erzielt. Zuletzt wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser in Kontakt gebracht.

Zur Fixierung wurden die Schnitte in eine Alkoholreihe in aufsteigender Konzentration, beginnen von 50 %, 70 %, 96 % und 100 % getaucht. Nach der Xylolbehandlung konnten die Schnitte mithilfe des Eindeckmediums (Dako) und jeweils eines Deckglases versiegelt werden.

**Tabelle 4. Geräteübersicht in alphabetischer Reihenfolge**

Gerätetyp	Hersteller
Autostainer Plus	Dako
Dampfgarer	Braun
Hyrax M55	Carl Zeiss
Kühlplatte TKF 22	MEDITE Medical GmbH
Medite Streckplatte OTS40	MEDITE Medical GmbH
Mikroskop	Leica, Olympus
TMArrayer	Pathology Devices
Wasserbad	Gehört zum Hyrax Mikrotom
Wärmeschrank	Heraeus

**Tabelle 5. Materialübersicht in alphabetischer Reihenfolge**

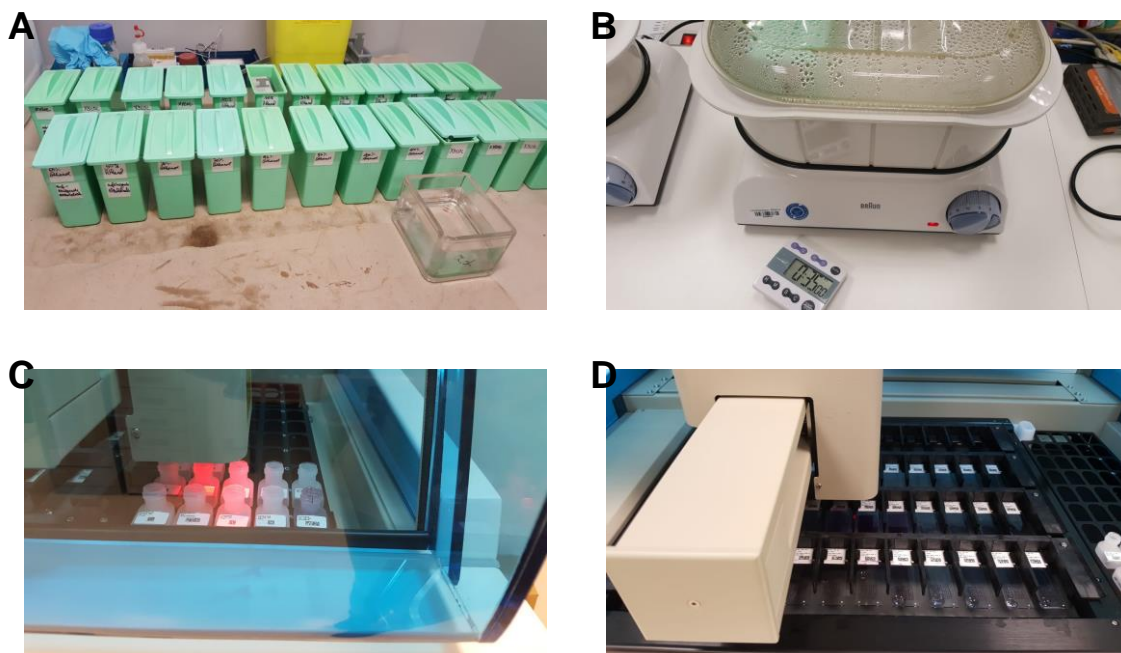
Materialtyp	Hersteller
Deckgläser	Knittel
Objektträger	Superfrost Plus
Pipetten	Eppendorf
Reagent Vial Kit 12 ml Rörchen	Dako Deutschland GmbH S342530

**Tabelle 6. Reagenzienübersicht in alphabetischer Reihenfolge**

Reagenzienart	Hersteller	Ansatz	
Citrat-Puffer	Dako	50*konzentriert, pH 6,1	
Diluent	Dako	Gebrauchsfertig	
EnVi- sion™Flex Kit (K8002) beinhaltet:	Dako		
	FlexBlock	Dako	Gebrauchsfertig
	FlexDAB (2-Komponentensystem aus Chromogen + Substrat- buffer)	Dako	Substrat 12 ml + 12 Trop- fen Chromogen
	FlexHRP	Dako	Gebrauchsfertig
	Rabbit	Dako	Gebrauchsfertig
	Mouse	Dako	Gebrauchsfertig
	Tris/EDTA-Puffer	Dako	50 * konzentriert, pH 9
	Wash Buffer (20 *)	Dako	1:20 verdünnt
Ethanol	Liquid Produc- tion GmbH		
Formalin	Sigma Aldrich	Auf 4 % angesetzt	
Hämalaun (EnvHema)	Dako	1+3 verdünnt mit Aqua dest.	
Xylol	Liquid Produc- tion GmbH	Gebrauchsfertig	

**Tabelle 7. Übersicht der verwendeten Antikörper in alphanumerischer Reihenfolge**

Primärantikörper	Hersteller	Wirt	REF-Nummer	Typus	Ansatz	Vorbehandlung
Anti-Factor H-AK	Abcam	Maus	ab118820	Monoklonal, IgG1	1:100	pH 6 (Citratpuffer)
Anti-CD59-AK	Abcam	Maus	ab9182	Monoklonal, IgG2a	1:50	pH 6
Anti-C5a-AK	Abcam	Maus	ab11877	Monoklonal, IgG2a	1:150	pH 6
Anti-Factor I-AK	Novusbio	Kaninchen	nbp1-88268	Polyklonal, IgG	1:200	pH 6
Anti-SUSD4-AK	ThermoFisher	Kaninchen	pa5-63552	Polyklonal, IgG	1:50	pH 9 (EDTA-Puffer)



**Abbildung 1. Immunhistochemische Färbung der TMA. (A)** Alkoholreihe. **(B)** Dampfgerät zur Demaskierung der Antigene. **(C)** und **(D)** Färbung mit dem Autostainer 480S.

### **3.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen**

Die weiteren Schritte erfolgten an eingescannten TMAs. Es wurde dazu entschieden, die Cores, die das peritumorale Gewebe darstellen sollten, nicht zu verwenden und das peritumorale Gewebe zu analysieren, das in den Tumor-Cores dargestellt war.

Die Auswertung der TMAs erfolgte mit QuPath-0.2.0 [102].

Als Erstes wurde der TMA-Dearrayer festgelegt und kontrolliert, dass alle Cores erkannt wurden.

Danach wurden mit einheitlich festgelegten Parametern die Zellen durch das System detektiert. Danach folgte die Klassifizierung der Zellen in Tumorzellen, Immunzellen und Stromazellen. Hierfür war die Einzeichnung von Annotationen notwendig. Man hat sich dafür entschieden, die TMAs einzeln zu klassifizieren.

Die Analyse der Anzahl der Immunzellen erfolgte nicht an den immunhistochemisch gefärbten Cores, sondern mittels HE-Cores, die aus einer Region stammen, die sich unmittelbar in der Nähe der entsprechenden Cores befand.

Zur Bestimmung der Färbungsintensität wurden drei Schranken für alle TMAs festgelegt.

Drüsenzellen, Artefakte, große nekrotische Bereiche und große Gefäße wurden rausgelöscht.

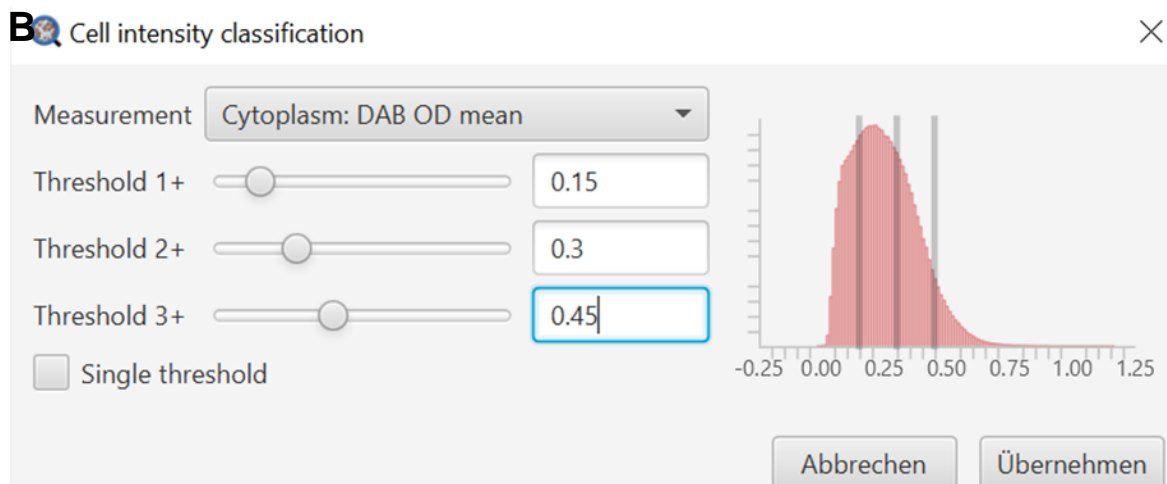
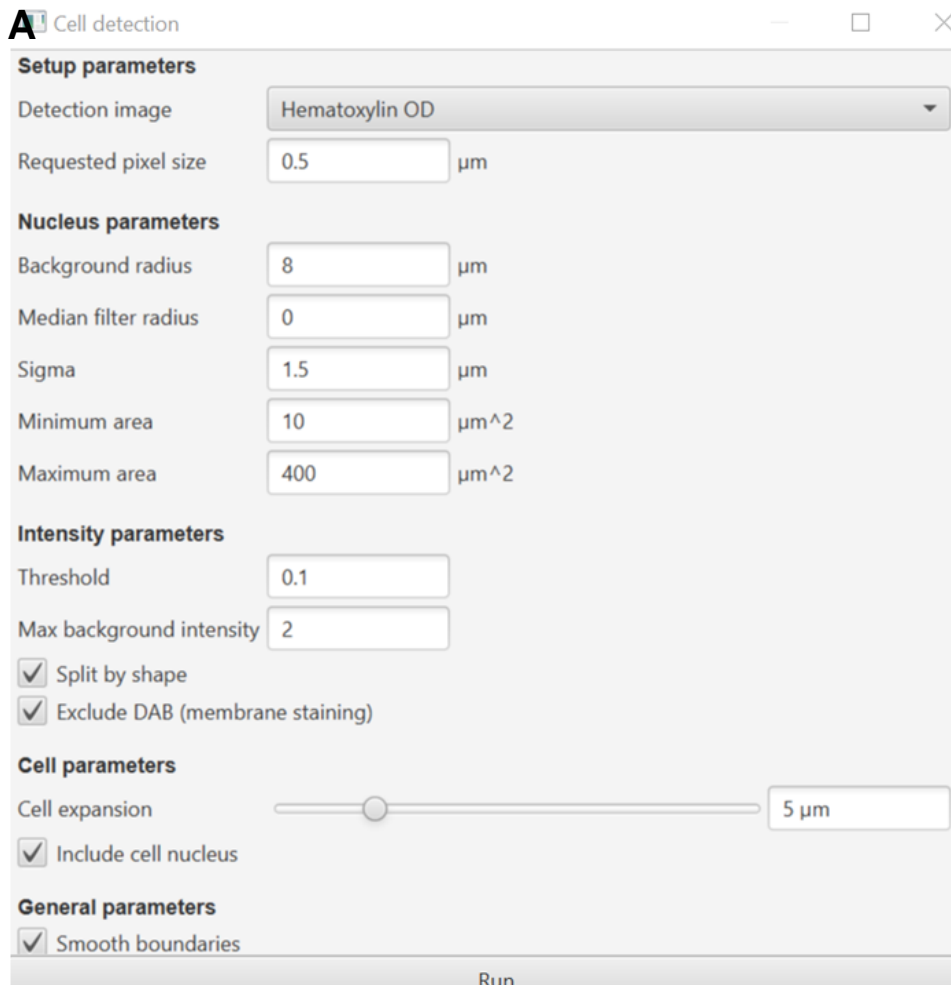
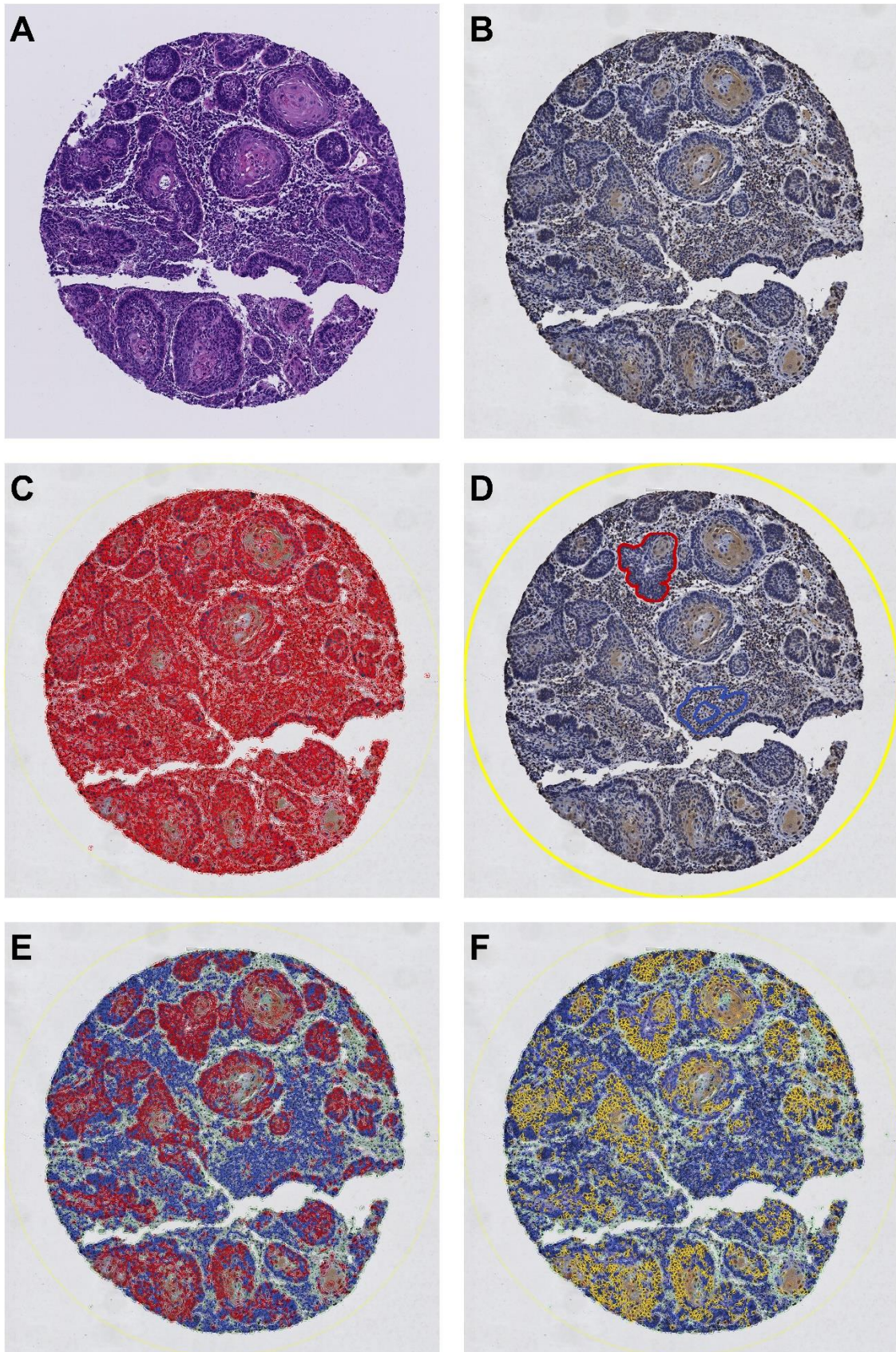


Abbildung 2. Färbungsanalyse mit QuPath-0.2.0. (A) Zelldetektion. (B) Selektion der Schranken zur Klassifizierung der Färbungsintensität



**Abbildung 3. Färbungsanalyse mit QuPath-0.2.0.** (A) TMA-Core nach HE-Färbung. (B) TMA-Core nach Immunhistochemie (DAB-Färbung). (C) immunhistochemisch gefärbter TMA-Core nach der Zelldetektion. (D) immunhistochemisch gefärbter TMA-Core mit eingezeichneten Annotationen. Die rote Annotation ist umkreist die Tumorzellen, die blaue Annotation umkreist die Immunzellen. (E) immunhistochemisch gefärbter TMA-Core nach Zellklassifizierung in Tumorzellen (rot), Immunzellen (blau) und Stromazellen (grün). (F) immunhistochemisch gefärbter TMA-Core nach Zellklassifizierung und Analyse der Färbungsintensität.

H-Scores:

Der H-Score dient der objektiven und reproduzierbaren Quantifizierung von Biomarkern bei immunhistochemischen Färbungsanalysen. Zur Bestimmung des H-Scores ist zunächst eine Einteilung der Zellen abhängig von der relativen Expression des Biomarkers in positiv und negativ nötig. Die positiven Zellen werden darüber hinaus nach der Färbungsintensität in stark (3+), mäßig (2+) und schwach (1+) klassifiziert. Der H-Score ist der Quotient aus der gewichteten Summe der Färbungsintensitäten und der gesamten Zellzahl. Infolgedessen beinhaltet der H-Score sowohl die Färbungsintensität als auch die Färbungsproportion. Die Skala bewegt sich von 0–300 [103].

Alternativ dazu verwenden manche Autoren den Allred-Score. Dieser Score ist die Summe von zwei separaten Variablen, von der Allred-Intensität und der Allred-Proportion. Bedingt durch die kleinere Skala, 0–8, wird der Allred-Score seltener benutzt und findet seine Anwendung nur noch hauptsächlich bei ER/PR Quantifizierung von Brusttumoren.

### **3.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit der Software GraphPadPrism (Version 9.4.1 für Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA; USA) vorgenommen.

Es wurden zur Erhöhung der Repräsentativität für jeden Fall jeweils zwei Schnitte einer Stanze entnommen, auf getrennten TMAs gefärbt und ausgewertet. Für die Statistische Analyse wurde der Mittelwert der einzelnen Output-Werte gebildet.

Aufgrund zahlreicher nicht parametrischer Variablen wurden nicht parametrische Tests angewendet. Zur Bewertung der Korrelation zweier Variablen verwendete man den Spearman-Test. Unterschiede zweier Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test detektiert, für den Vergleich mehrerer Gruppen verwendete man den Kruskal-Wallis-Test. Mithilfe der Kaplan-Meier-Kurve wurde das Gesamtüberleben verschiedener Gruppen dargestellt, dabei diente der Log-Rank-Test zur Evaluation der Unterschiede zwischen zwei Survivalkurven.

Ein p-Wert von 0,05 oder kleiner wurde als signifikant betrachtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung des Kollektivs

Das endgültige Kollektiv umfasste 164 Patienten, die in der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum 2008–2020 vorstellig waren. Von diesen Patienten standen 122 histologisch gesicherte Tumorschnitte des Oropharynxtumors und 64 Schnitte der Lymphknotenmetastase des Oropharynxkarzinoms zur Verfügung. Exklusionskriterium waren eine vorausgegangene Radiochemotherapie in der Kopf-Hals-Region und der Rezidivtumor.

#### 4.1.1 Tumor

Das 5-Jahresüberleben des Tumorkollektivs betrug 68,7 %. Von insgesamt 122 Patienten des Tumorkollektivs lag bei 26 Patienten (21,31 %) ein T1-Stadium, bei 41 Patienten (33,61 %) ein T2-Stadium, bei 28 Patienten (22,95 %) ein T3-Stadium und bei 27 Patienten (22,13 %) ein T4-Stadium vor. Hinsichtlich des N-Stadiums war das N2-Stadium mit 68 Patienten (55,74 %) am häufigsten vertreten, gefolgt vom N0-Stadium mit einer Anzahl von 34 Patienten (27,87 %), und dem N1-Stadium mit 17 Patienten (13,98 %) und zuletzt dem N3-Stadium mit 2 Patienten (1,64 %). Bei einem Fall (0,82 %) war das N-Stadium unbekannt. 109 Patienten (89,34 %) wiesen keine Fernmetastasen auf, 11 Patienten (9,02 %) wurde das M1-Stadium zugeordnet. Bei 2 Patienten (1,64 %) war das M-Stadium unbekannt (Abbildung 4).

Der Anteil der HPV-positiven Tumore innerhalb des Tumorkollektivs war mit nahezu 37 % vergleichbar mit den Angaben in weiteren Studien, die eine Prävalenz von ungefähr 40 % berichteten [10]. Viele Merkmale der HPV-positiven Tumore konnten in dieser Arbeit zudem bestätigt werden. Bei Untersuchung des Survivals der Patienten getrennt nach dem HPV-Status, konnte das verbesserte Survival bei HPV-Assoziation beim Tumorkollektiv nicht bestätigt werden. Das verbesserte Überleben ließ sich allerdings erst bei Einbeziehung der Patientendaten, von denen die Lymphknotenmetastasen der Oropharynxtumore untersucht werden sollten, bestätigen (Abbildung 5).

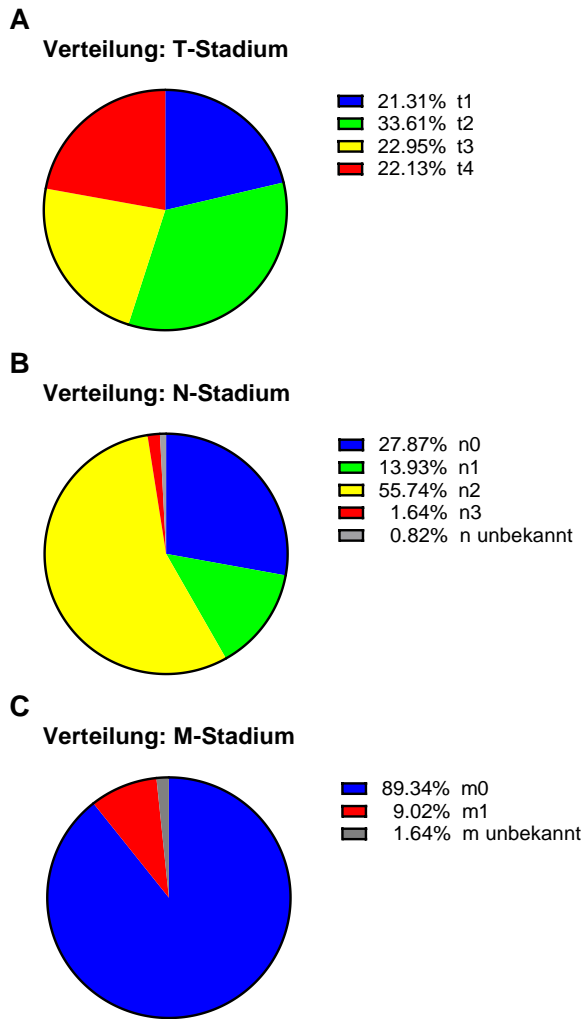


Abbildung 4. Verteilung des TNM-Stadiums (A–C) bei Primärtumoren (n = 122).

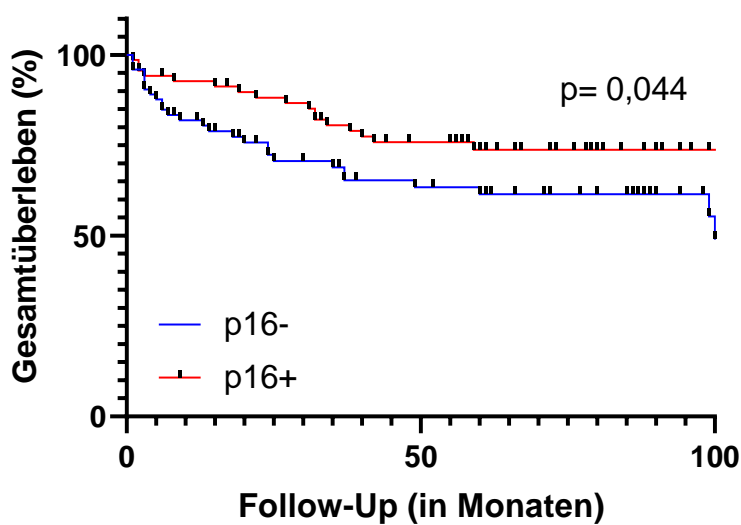
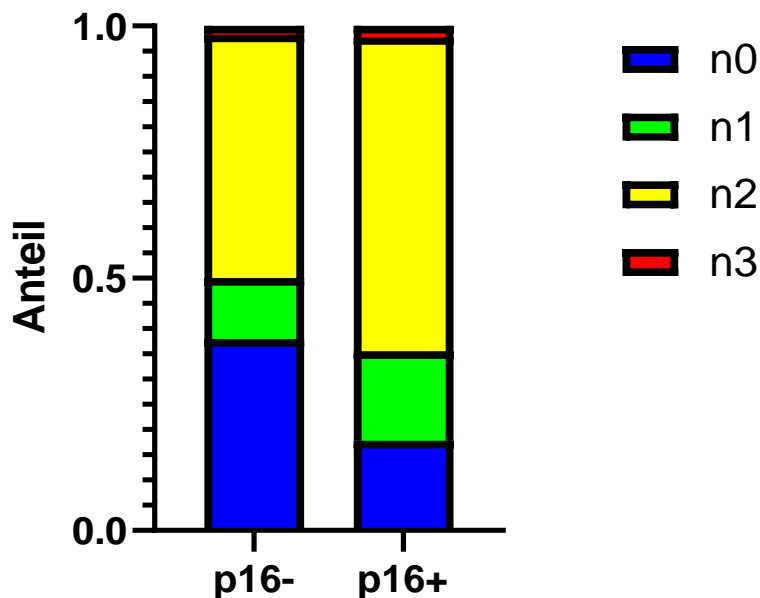


Abbildung 5. Kaplan-Meier-Analyse zur Darstellung des OS in Abhängigkeit vom HPV-Status des Gesamtkollektivs (n = 143). Von 164 Patienten waren 70 Patienten p16+, 73 Patienten p16-. Bei 21 Patienten war der p16-Status unbekannt. Die Patienten mit unbekanntem HPV-Status wurden nicht inkludiert. p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test, p = 0,044

## Ergebnisse

Die Patienten mit HPV-positiven Tumoren zeigten im Vergleich zu den HPV-negativen Tumoren hinsichtlich der Verteilung des T-Stadiums eine Linksverschiebung, während sie bei dem N-Stadium eine Rechtsverschiebung zeigten. Bei den HPV-positiven Tumoren betrug der Anteil des T-Stadiums in aufsteigender Reihenfolge gerundet 22 %, 47 %, 20 %, 11 % und der des N-Stadiums 18 %, 18 %, 62 % und 2 %. Bei HPV-negativen Tumoren waren die Werte des T-Stadiums 28 %, 22 %, 28 % und 22 % und die Werte des N-Stadiums waren 38 %, 12 %, 48 % und 2 % (Abbildung 6). Das deckt sich mit der Beobachtung aus vielen Studien [3], dass Patienten mit HPV-Assoziation bei Erstdiagnose durch ein geringes T-Stadium und hohes N-Stadium charakterisiert sind. Das Vorkommen der HPV-positiven Tumore deutlich in den jüngeren Jahren im Vergleich zu den HPV-negativen Tumoren, das in vielen Studien gezeigt werden konnte, konnte bei dem Kollektiv nicht beobachtet werden [4].



**Abbildung 6.** Verteilung des N-Status des Tumorkollektivs in Abhängigkeit vom HPV-Status (n = 103). Patienten mit unbekanntem HPV-Status (n = 19) wurden nicht eingeschlossen. Von 58 HPV-negativen Patienten waren 22 Patienten im N0, 7 Patienten N1, 28 Patienten N2 und 1 Patient N3 klassifiziert. Von 45 HPV-positiven Patienten waren 8 Patienten N0, 8 Patienten N1, 28 Patienten N2 und 1 Patient N3 klassifiziert.

Das HPV-negative Kollektiv wurde in Abhängigkeit vom Vorhandensein mindestens einer Lymphknotenmetastase in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Gruppe mit Lymphknotenmetastasierung wies ein schlechteres Overall Survival auf ( $p = 0,0433$ ) (Abbildung 7). Teilte man das Kollektiv entsprechend der präzisen N-Klassifikation ein, konnte ein abnehmendes Survival bei steigender N-Klassifikation beobachtet werden (Abbildung 8). Daneben korrelierte das Survival der HPV-negativen Patienten auch negativ mit dem T- und M-Stadium.

## Ergebnisse

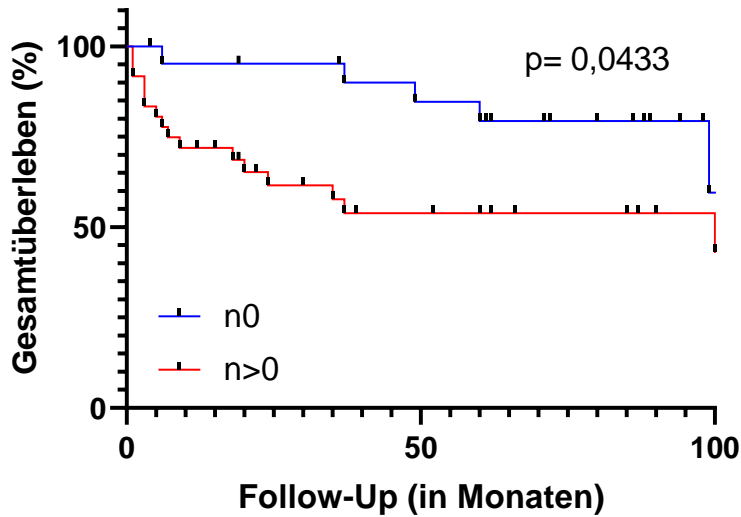


Abbildung 7. Kaplan-Meier-Analyse zur Darstellung des OS in Abhängigkeit von der Lymphknotenmetastasierung bei HPV-negativen Tumoren des Tumorkollektivs (n = 58). p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test, p = 0,0433.

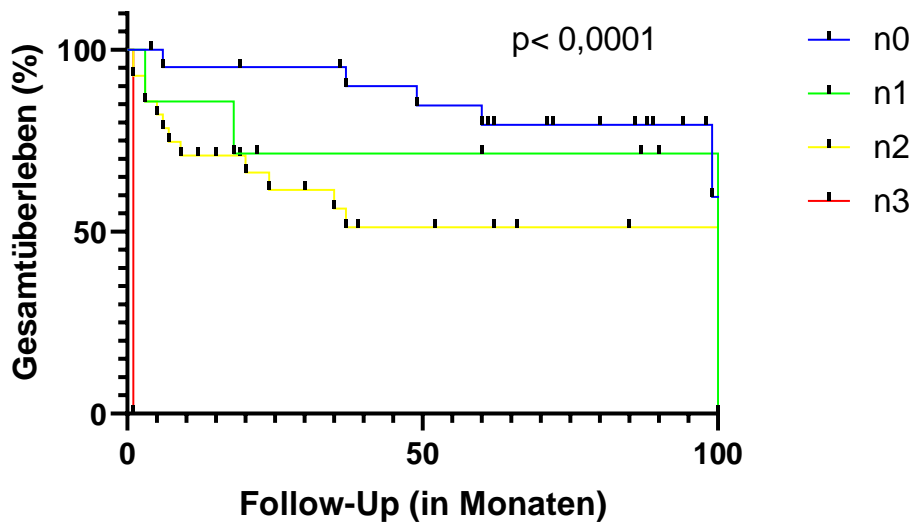


Abbildung 8. Kaplan-Meier-Analyse zur Darstellung des OS in Abhängigkeit von der N-Klassifikation bei HPV-negativen Tumoren des Tumorkollektivs (n = 58). p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test,  $p < 0,0001$ .

Demgegenüber war die N-Klassifikation bei HPV-positiven Tumoren nicht signifikant ausschlaggebend für das Survival (Abbildung 9). Dieses Ergebnis zeigte, dass möglicherweise die Lymphknotenmetastasierung prognostisch einen anderen Stellenwert in Abhängigkeit des HPV-Status hat.

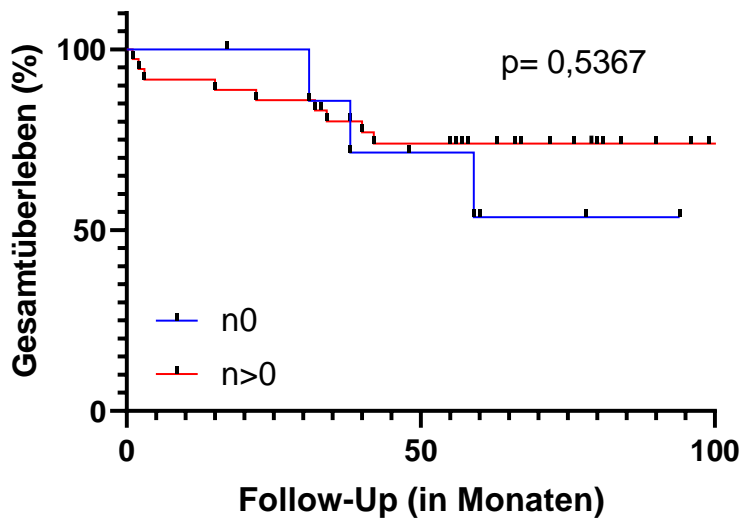


Abbildung 9. Kaplan-Meier-Analyse zur Darstellung des OS in Abhängigkeit von der Lymphknotenmetastasierung bei HPV-positiven Tumoren des Tumorkollektivs (n = 45). p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test, p = 0,5367.

#### 4.1.2 Lymphknoten

Das Kollektiv von Lymphknotenmetastasen der Oropharynxtumore umfasste insgesamt 64 Fälle. Es waren nur Lymphknotenmetastasen von Primärtumoren der N1- und N2-Klassifikation vertreten. Den überwiegenden Anteil des Kollektivs bildeten dabei die Lymphknotenmetastasen der N2-Tumore (85,94 %). Die Patienten des Kollektivs waren vorwiegend Raucher (75 %) und waren bezüglich des HPV positiv diagnostiziert (56,25 %).

Ergebnisse

**Tabelle 8. Klinisch-pathologische Parameter des Tumorkollektivs**

Variable	Mittelwert	n	%
alle Patienten		122	100,00
Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	61,11		
Geschlecht			
männlich		89	72,95
weiblich		33	27,05
OS (Monate)	52,84		
Rezidiv (ja/nein)			
nein		100	81,97
ja		22	18,03
RFS (Monate) bei Rezidivtumoren	18,64		
T-Stadium			
T1		26	21,31
T2		41	33,61
T3		28	22,95
T4		27	22,13
N-Stadium			
N0		34	27,87
N1		17	13,93
N2		68	55,74
N3		2	1,64
N unbekannt		1	0,82
M-Stadium			
M0		109	89,34
M1		11	9,02
M unbekannt		2	1,64
Tabak ja/nein			
nein		17	13,93
ja		89	72,95
unbekannt		16	13,11
Tabakkonsum			
1		17	13,93
2		21	17,21
3		2	1,63
4		3	2,46
5		4	3,28
unbekannt		75	61,48
Alkohol			
1		12	9,84
2		22	18,03
3		46	37,70
unbekannt		42	34,43
p16-Status			
p16-negativ		58	47,54
p16-positiv		45	36,89
unbekannt		19	15,57
extranodales Wachstum ja/nein			
0 (nein)		23	18,85
1 (ja)		24	19,67
unbekannt		75	61,48

Veraltete 7. Auflage der TNM-Klassifikation, Tabakkonsum in aufsteigender Reihenfolge 1 = 0 py, 2 > 0 py, 3 ≤ 5 py, 4 ≤ 10 py, 5 ≤ 20 py, 6 > 20 py, Alkoholkonsum in aufsteigender Reihenfolge 1 = kein, 2 = mäßig, 3 = hoch.

**Tabelle 9. Klinisch-pathologische Parameter des Lymphknotenmetastasenkollektivs**

Variable	Mittelwert	n	%
alle Patienten		64	100,00
Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	61,53		
Geschlecht			
männlich		42	65,63
weiblich		22	34,38
OS (Monate)	55,83		
Rezidiv (ja/nein)			
nein		48	75,00
ja		16	25,00
RFS (Monate) bei Rezidivtumoren	23,94		
T-Stadium			
T1		18	28,13
T2		21	32,81
T3		15	23,44
T4		10	15,63
N-Stadium			
N0		0	0,00
N1		9	14,06
N2		55	85,94
N3		0	0,00
N unbekannt		0	0,00
M-Stadium			
M0		58	90,63
M1		5	7,81
M unbekannt		1	1,56
Tabak ja/nein			
nein		11	17,19
ja		48	75,00
unbekannt		5	7,81
Tabakkonsum			
1		11	17,19
2		13	20,31
3		0	0,00
4		2	3,13
5		2	3,13
6		31	48,44
unbekannt		5	7,81
Alkohol			
1		7	10,94
2		19	29,69
3		15	23,44
unbekannt		23	35,94
p16-Status			
p16-negativ		24	37,50
p16-positiv		36	56,25
unbekannt		4	6,25
extranodales Wachstum ja/nein			
0		27	42,19
1		24	37,50
unbekannt		13	20,31

Veraltete 7. Auflage der TNM-Klassifikation, Tabakkonsum in aufsteigender Reihenfolge 1 = 0 py, 2 > 0 py, 3 ≤ 5 py, 4 ≤ 10 py, 5 ≤ 20 py, 6 > 20 py, Alkoholkonsum in aufsteigender Reihenfolge 1 = kein, 2 = mäßig, 3 = hoch.

## 4.2 Charakterisierung der immunhistochemischen Färbung

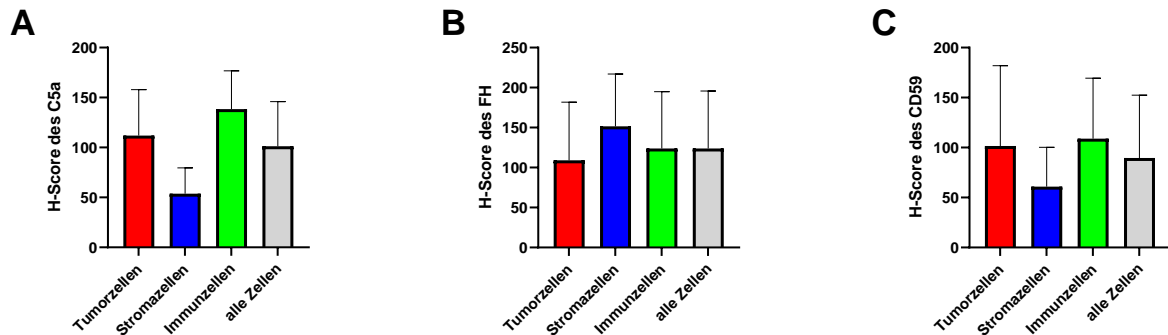


Abbildung 10. Durchschnittlicher H-Score einzelner Zellarten des Primärtumors im Vergleich. (A) C5a, (B) Faktor H, (C) CD59.

Der Faktor H war vor allem im Stroma sehr stark vertreten (Abbildung 10). Die Fibroblasten sowie das Kollagen waren stark gefärbt. Zudem waren die Gefäßendothelzellen auch gefärbt. Die Zellmembran der Tumorzellen war gefärbt, insbesondere konzentrierte sich die Färbung interzellulär. Stellenweise war das Zytoplasma auch gefärbt. Es soll hierbei auf den vorausgegangenen Abschnitt über Faktor H hingewiesen werden. Faktor H bindet an Polyanione, die vor allem in der Membran und in der Extrazellulärmatrix vorhanden sind. Kapka et al. beobachteten bei der Färbungsanalyse von Ovarialtumoren mit FH/FH-like auch eine starke Konzentration der Immunreaktivität im Tumorstroma und in Blutgefäßen [104]. Auch Johnson et al. färbten immunhistochemisch Samples von cSCC an und berichten von einer intrazellulären Färbung und der Färbung der extrazellulären Matrix. Außerdem beobachteten sie anhand der Immunfluoreszenzmikroskopie von kultivierten cSCC-Zellen, dass sich die Färbung intrazellulär punktuell darstellte und vermuteten intrazelluläre Vesikel [105]. Daugan et al. unterschieden zwei Kompartimente der Färbungslokalisierung in Tumorzellen, zum einen die membranöse und zum anderen die intrazelluläre Färbung. Sie fanden heraus, dass sich die intrazelluläre Lokalisierung des Faktor H hauptsächlich auf Lysosomen beschränkte und fügten hinzu, dass der Faktor H auch bei niedrigem pH-Wert stabil ist und in seiner Funktion in den Lysosomen nicht beeinträchtigt wird [106].

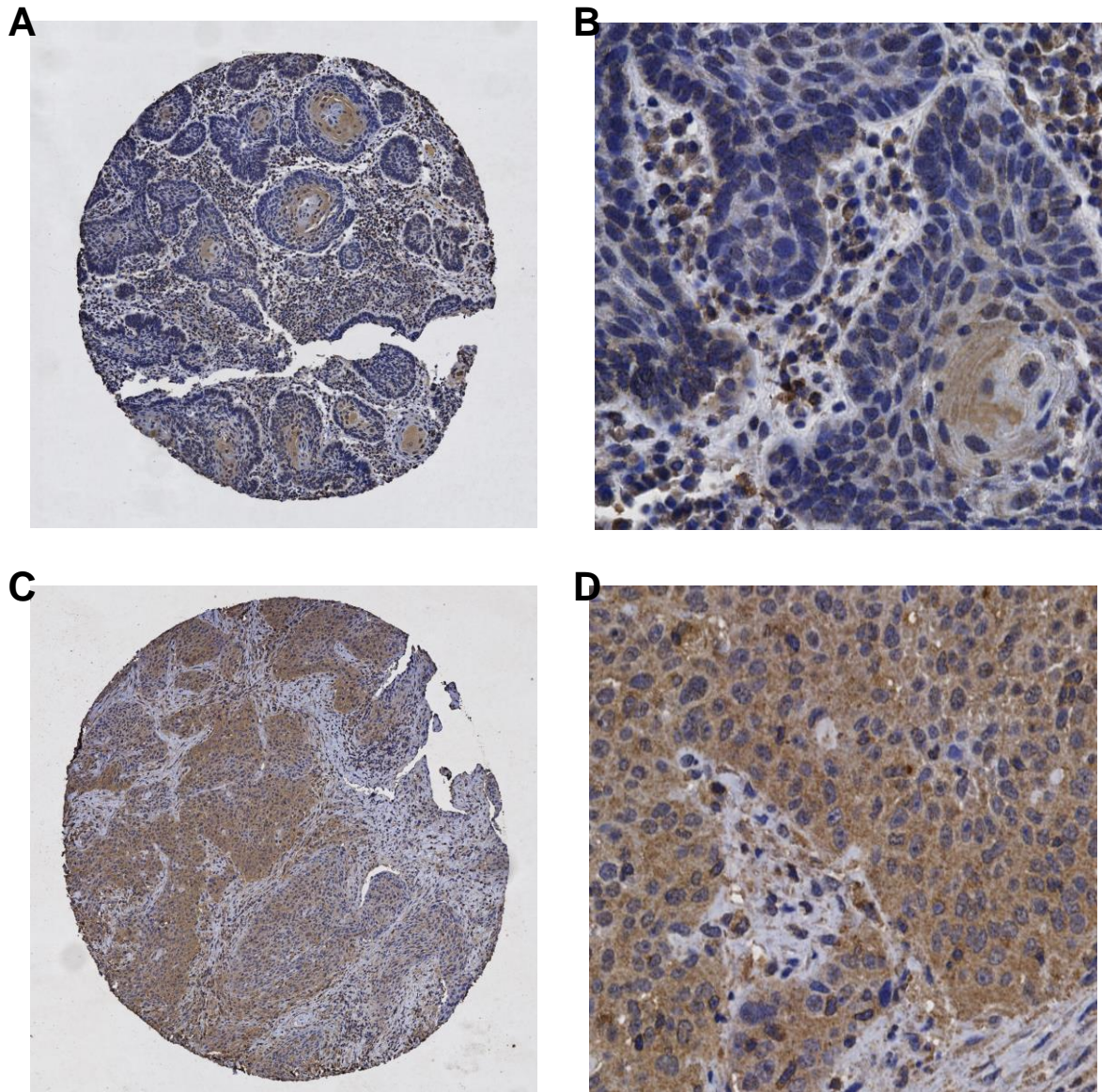
Das CD59 färbte das Stroma und die Fibroblasten kaum an.

Bei den Tumorzellen zeigte sich eine erhöhte Färbungsintensität bei der dem Stroma zugewandten Seite. Dabei war die Zellmembran sehr stark gefärbt, das Zytoplasma war nur sehr leicht angefärbt. Möglicherweise war eine Kernfärbung vorhanden. Kapka et al. färbten immunhistochemisch Schnitte von Ovarialkarzinomen mit CD59, neben dem bereits oben erwähnten FH, an und beobachteten, dass die Färbung sowohl im Zytoplasma als auch in der Zellmembran von

## Ergebnisse

Tumorzellen vertreten war. Gefäßstrukturen waren im Tumorgewebe ebenso positiv gefärbt. Sie entdeckten auch eine stärkere Immunreaktivität in der Randzone zwischen normalem und malignem Gewebe [104].

Der Komplementfaktor C5a färbte Stromazellen an, das Kollagen blieb von der Färbung unbeeinträchtigt. Interessanterweise war vor allem das Zytoplasma der Tumorzellen neben der Zellmembran gefärbt. Aus rein subjektiver Sicht erschien die Färbung zentral, bei denen auch vereinzelt Hornperlen vorhanden waren, intensiver. Bei der Färbung mit C5a waren die Immunzellen stark betroffen. Anders als bei den Komplementinhibitoren waren die mukösen Drüsen nicht braun gefärbt. Imamura et al. färbten immunhistochemisch Gewebeschnitte von Mammakarzinomen mit Antikörpern gegen den C5a-Rezeptor an und konnten sehen, dass C5a-Rezeptoren vor allem in der Zellmembran lokalisiert waren. Nicht kanzerogene Drüsenzellen waren von der Färbung unbeeinträchtigt [58]. Yang et al. färbten immunhistochemisch TMAs von metastasierten Nierenzellkarzinomen ein und konnten feststellen, dass die Färbung vorherrschend in der Zellmembran und im Zytoplasma vertreten war [96]. Auch Xi et al. beobachteten bei der immunhistochemischen Färbung von renalen Klarzellkarzinomen mit anti-C5a-Antikörpern, dass das C5a vorherrschend in der Zellmembran und in der extrazellulären Matrix vom Tumorgewebe lokalisiert war. Peritumoral war das C5a nur diffus vorhanden [107]. Zahlreiche Studien belegen das Vorhandensein des intrazellulären Komplementsystems in Tumorzellen und Immunzellen [108]. Yoneda et al. konnten eine erhöhte C5aR-Expression bei urothelialen Karzinomzellen in der invasiven Front erkennen und deuteten auf eine mögliche Beteiligung der C5a-Rezeptoren bei der Invasion hin [109].



**Abbildung 11. Immunhistochemische Analysen von C5a in OPSCC.** (A) Repräsentatives Beispiel für ein Tumorcore mit kleinem H-Score und in (B) 100-facher Vergrößerung. (C) Repräsentatives Beispiel für ein Tumorcore mit großem H-Score und in (D) 100-facher Vergrößerung

### 4.3 P16-positive Tumore weisen mehr Immunzellen und weniger Faktor H auf

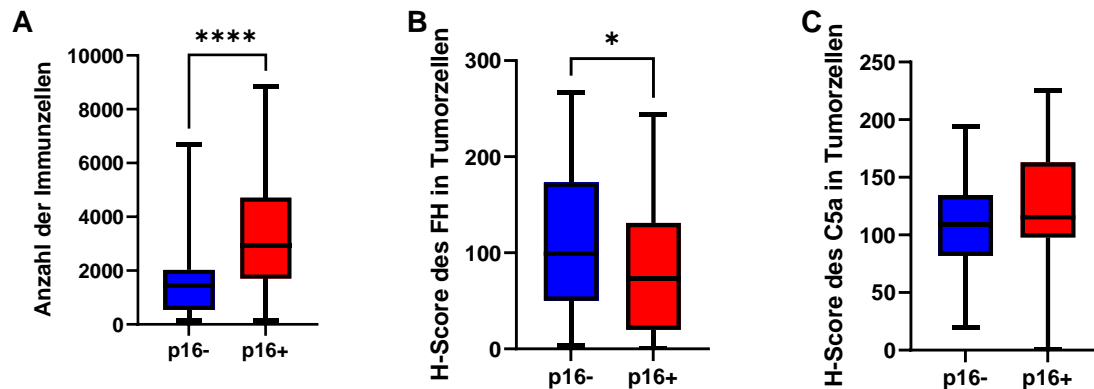


Abbildung 12. Boxplots zur Darstellung der Anzahl der Immunzellen, des H-Scores des FH und C5a in Tumorzellen abhängig vom HPV-Status. (A) Anzahl der Immunzellen nach HPV-Status, p-Wert berechnet nach Mann-Whitney-U-Test,  $p < 0,0001$ . (B) H-Score des FH in Tumorzellen nach HPV-Status, p-Wert berechnet nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,0248$  und (C) H-Score des C5a in Tumorzellen nach HPV-Status, p-Wert berechnet nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,1342$ .

Eines der Ziele unserer Arbeit war es, Oropharynxkarzinome auf Parameter des Immunsystems zu untersuchen und den Unterschied im Survival zwischen HPV-negativen und HPV-positiven Tumoren zu erklären. Zur Beantwortung jener Fragestellungen untersuchten wir zunächst die Schnitte auf Zusammensetzung der Zellpopulationen und deren Färbeverhalten in Bezug auf Komplement-Bestandteile und -Inhibitoren. Die TMA-Cores der HPV-positiven Oropharynx-tumore wiesen im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren eine signifikant erhöhte Immunzellzahl auf ( $p < 0,0001$ ; Abbildung 12). Außerdem war der H-Score des FH der Tumorzellen bei HPV-positiven Oropharynxkarzinomen erniedrigt ( $p = 0,0248$ ).

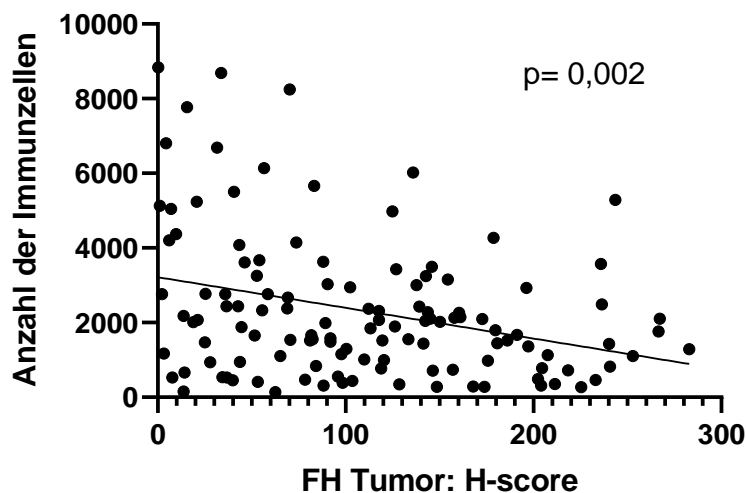
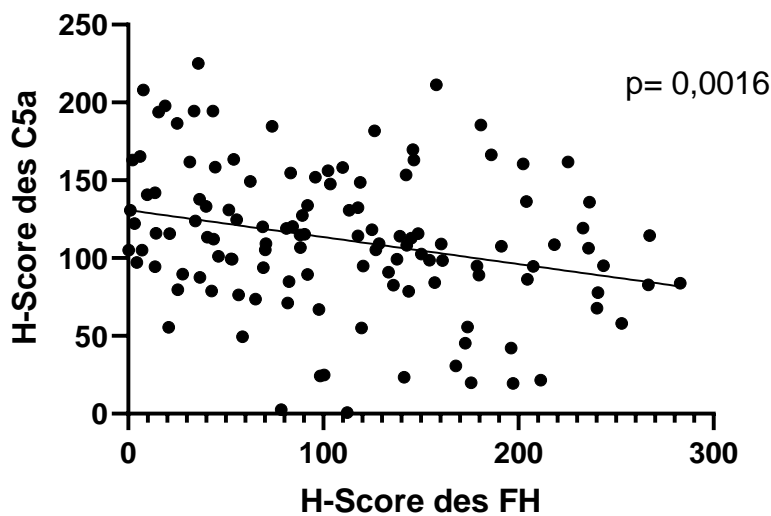


Abbildung 13. Scatterplot zur Darstellung der Anzahl der Immunzellen nach dem H-Score des FH in Tumorzellen. p-Wert berechnet nach Spearman-Test,  $p = 0,002$ .

Bei Betrachtung der mit Faktor H gefärbten Tumor-Cores ließ sich der Verdacht aufstellen, dass möglicherweise der FH-H-Score mit der Anzahl der Immunzellen zusammenhängt, da die Cores mit vielen Immunzellen keine Braunfärbung durch FH aufwiesen. Die Immunzellzahl der Cores von Oropharynxkarzinomen korrelierte negativ mit dem H-Score des Faktor H (Spearman,  $p = 0,002$ ) (Abbildung 13). Das spiegelt eine Schnittstelle zwischen der unspezifischen, vertreten durch den Komplementinhibitor Faktor H, und spezifischen Immunabwehr wider.



**Abbildung 14.** Scatterplot zur Darstellung des C5a-H-Scores gegen FH-H-Score. p-Wert berechnet nach Spearman,  $p = 0,0016$ .

Das Molekül C5a stellt einen Komplementfaktor dar. Dies lässt die Vermutung zu, dass das C5a und der Komplementinhibitor, Faktor H, eventuell nicht in gleicher Menge im Gewebe vorhanden sind. Die negative Korrelation zwischen dem Tumor-H-Score vom Komplementfaktor C5a und dem Tumor-H-Score vom Komplementinhibitor FH ließ sich anhand des Spearman-Tests bestätigen ( $p = 0,0016$ ) (Abbildung 14). Teilte man das Gesamtkollektiv weiter nach dem HPV-Status auf, konnte bei p16-positiven Tumoren eine vergleichbare Korrelation ( $p = 0,0142$ ) festgestellt werden. Die p16-negativen Tumore zeigten keine signifikante Korrelation zwischen dem C5a-H-Score und dem FH-H-Score (Abbildung 15).

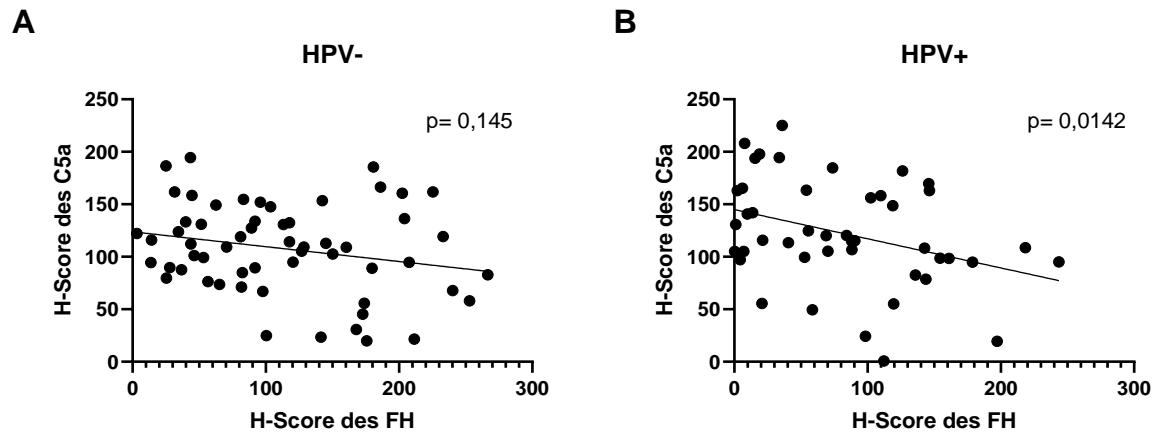
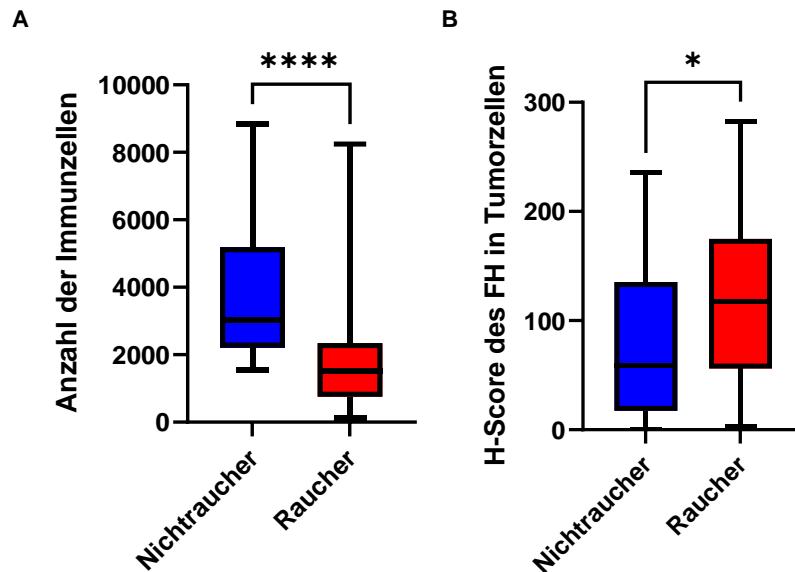


Abbildung 15. Scatterplot zur Darstellung des C5a-H-Scores gegen FH-H-Score für HPV-negative und HPV-positive Tumore. p-Wert berechnet nach Spearman.

#### 4.4 Der Tabakkonsum verändert die Tumormikroumgebung im Primärtumor



**Abbildung 16.** Boxplots zur Darstellung der Immunzellzahl und H-Score des FH in Tumorzellen in Abhängigkeit vom Tabakkonsum. (A) Immunzellzahl der Nichtraucher und Raucher im Vergleich, p-Wert berechnet nach Mann-Whitney-U-Test,  $p < 0,0001$  und (B) H-Score des FH in Tumorzellen der Nichtraucher und Raucher im Vergleich, p-Wert berechnet nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,0157$ .

Der Tabakkonsum stellt neben der Infektion mit dem HP-Virus den wesentlichen, aber vermeidbaren, Risikofaktor dar. Es wurde untersucht, wie sich das Immunmilieu zwischen Rauchern und Nichtrauchern unterscheidet. Bei Betrachtung der Immunzellzahl und des H-Score des FH in Tumorzellen abhängig vom Tabakkonsum, konnte eine verringerte Immunzellzahl bei Rauchern und ein erhöhter H-Score des FH in Tumorzellen festgestellt werden (Abbildung 16). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zum Ergebnis in Abhängigkeit vom HPV-Status, denn aufgeteilt nach dem HPV-Status, waren die Immunzellzahl bei HPV-positiven Fällen erhöht und der H-Score des FH in Tumorzellen erniedrigt. Das stimmt mit den Beobachtungen der bisher bekannten Literatur überein, dass sich Tumore mit HPV-Assoziation durch höhere Immuninfiltration auszeichnen und als heiße Tumore bezeichnet werden, während der Tabakkonsum mit einer verringerten Immuninfiltration einhergeht.

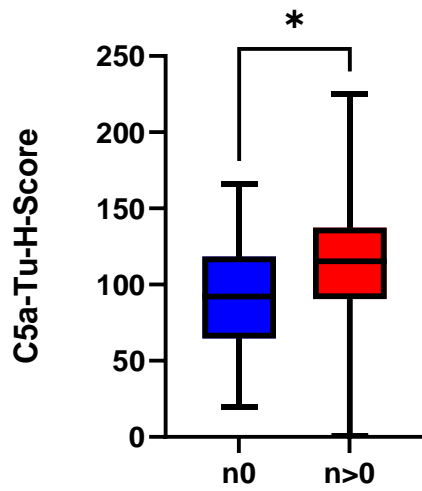


Abbildung 17. Boxplots zur Darstellung des C5a-H-Scores von Tumorzellen in Abhängigkeit vom N-Stadium bei Rauchern. p-Wert berechnet nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,02$ .

Raucher wurden separat betrachtet. Raucher mit Lymphknotenmetastasen wiesen einen erhöhten C5a-H-Score auf als Raucher, bei denen ein N0-Tumor diagnostiziert wurde (Abbildung 17). Das N-Stadium korrelierte mit dem C5a-Tu-H-Score bei Patienten mit negativem HPV-Status und positiver Tabakkonsum-Anamnese (p-Wert berechnet nach Spearman,  $p = 0,0135$ ).

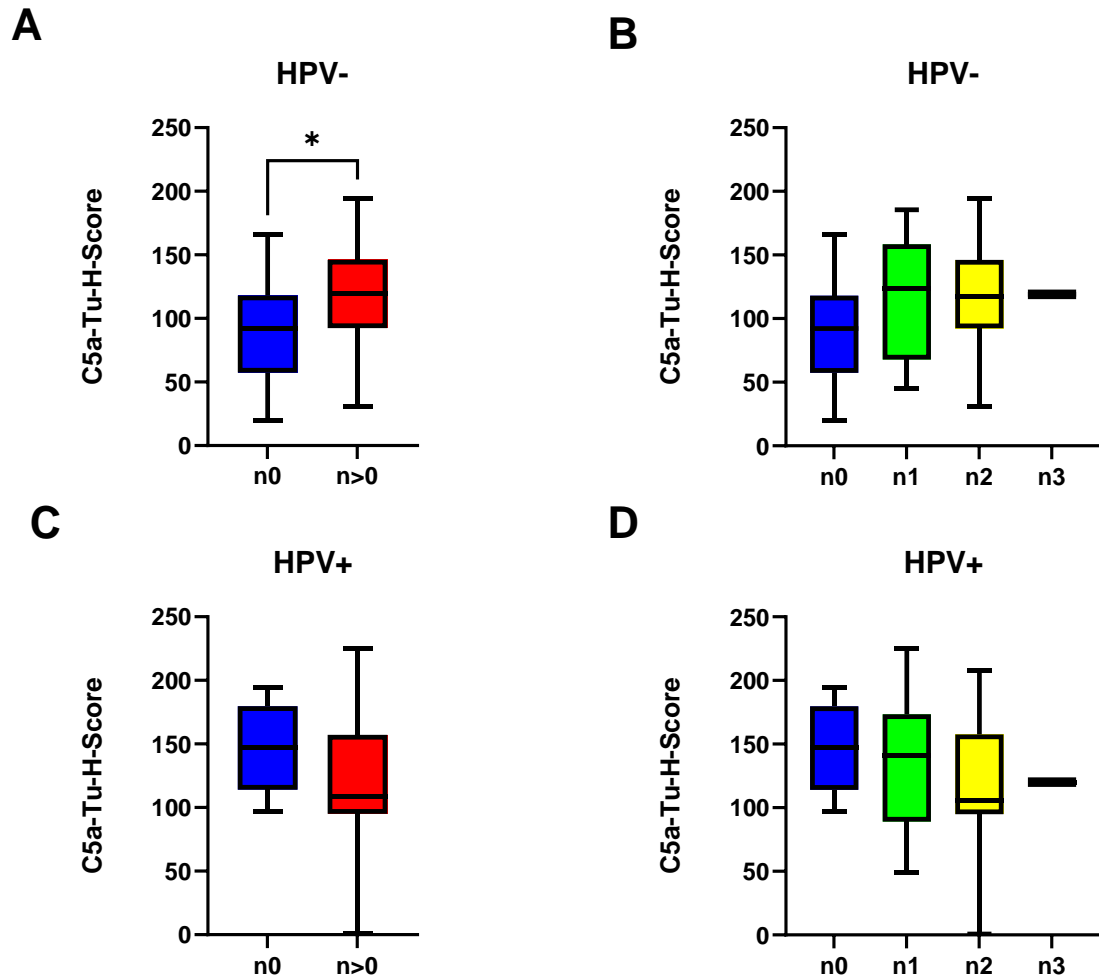
#### **4.5 Immuzellinfiltrat, der Komplementinhibitor Faktor H und die Komplementaktivität beeinflussen das Risiko einer Lymphknotenmetastasierung**

Wie in den vorausgegangenen Abbildungen gezeigt, konnte ein signifikanter Einfluss des N Stadiums auf das Patientenüberleben festgestellt werden. Die Metastasierung von Plattenepithelkarzinomen stellt einen der Hauptgründe für die Mortalität der Erkrankung dar [110]. Wie jedoch das Risiko einer Metastasierung durch das Immunsystem beeinflusst wird, ist nicht abschließend geklärt. In unseren Beobachtungen konnten wir signifikante Unterschiede in der Ansammlung von Komplementbestandteilen und Immuzellinfiltrat feststellen. Wir wollten daher untersuchen, ob sich N-Stadium und Komplementinhibitoren bzw. Immuzellinfiltrat in unserem Kollektiv beeinflussen.

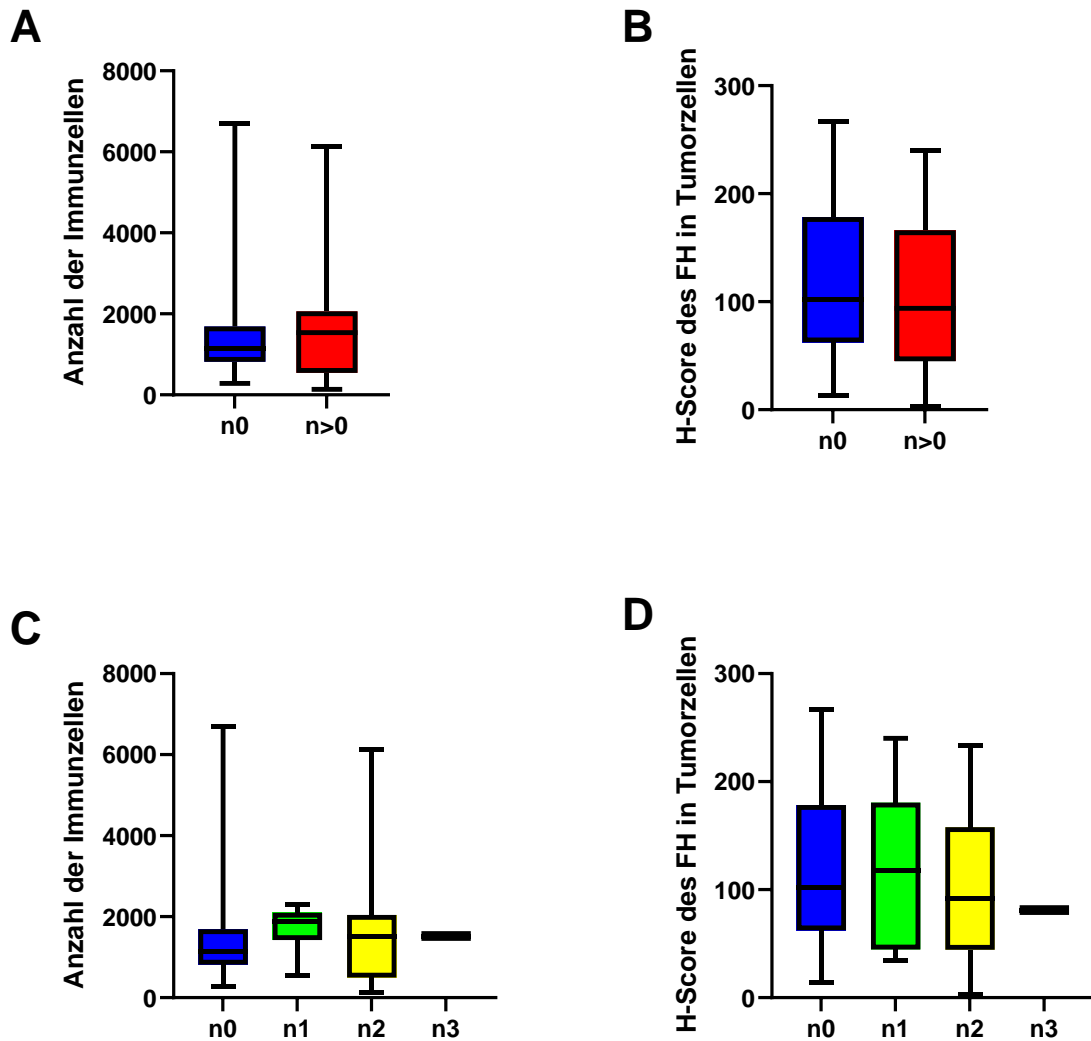
Die N0-Tumore des Gesamtkollektivs zeigten innerhalb ihrer Gruppe keine signifikanten Unterschiede zu Tumoren mit Lymphknotenmetastasierung hinsichtlich des H-Scores von Komplementkomponenten C5a, FH und der Immuzellzahl.

Die Analyse der Primärtumore nach Aufteilung nach dem HPV-Status zeigte erstaunlicherweise eine voneinander abweichende Zusammensetzung des Tumormilieus. Bei p16-negativen Tumoren war der H-Score des Komplementfaktors C5a bei Vorhandensein mindestens einer Lymphknotenmetastase im Vergleich zu N0-Tumoren signifikant erhöht (Abbildung 18). Demgegenüber war der H-Score des C5a bei p16-positiven Tumorzellen nach Lymphknotenmetastasierung tendenziell erniedrigt.

Hinsichtlich des H-Scores des Faktor H und der Immuzellzahl konnte bei p16-negativen Tumoren keine signifikante Änderung je nach N-Status beobachtet werden (Abbildung 19).



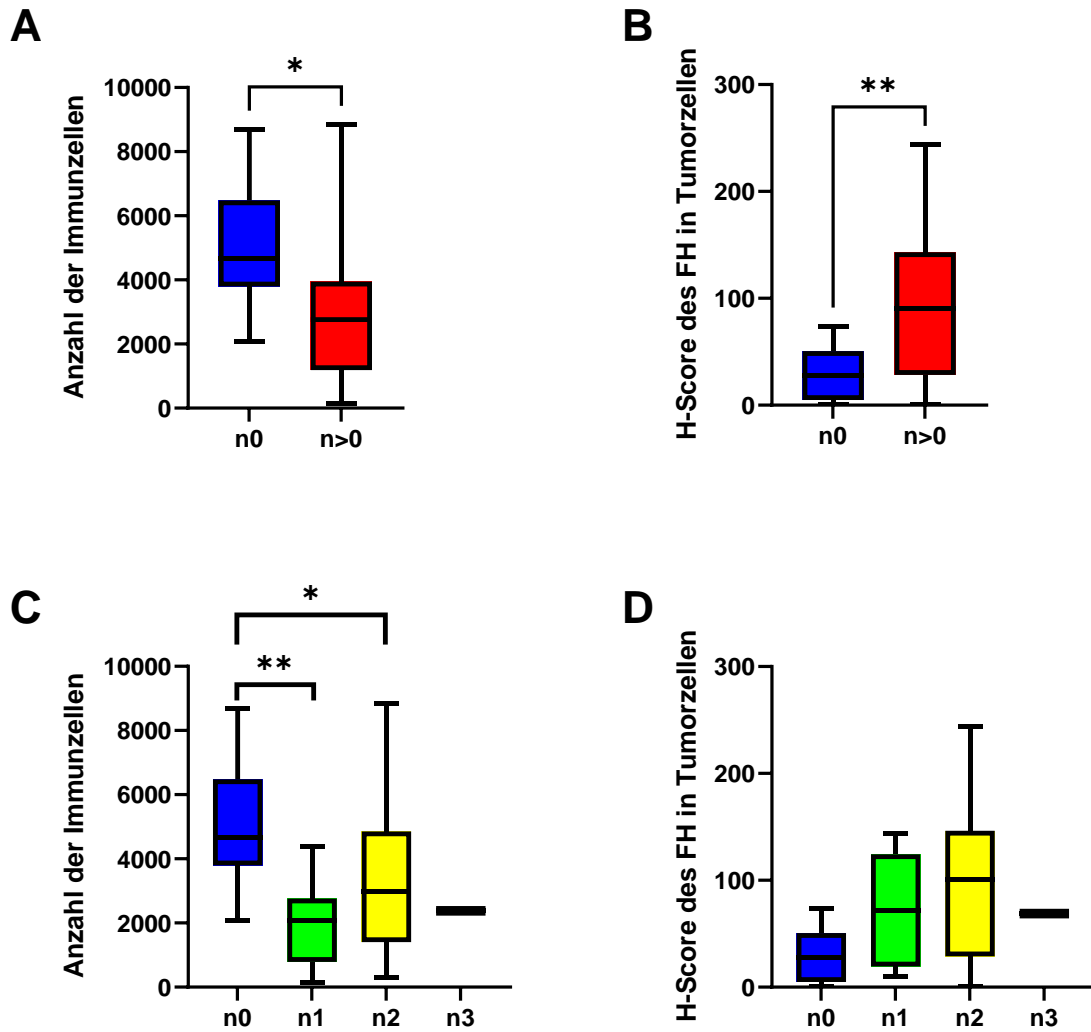
**Abbildung 18.** Boxplots zur Darstellung des durchschnittlichen H-Scores von C5a in Abhängigkeit von N-Kategorie bei (A) und (B) HPV-negativen Tumoren und (C) und (D) HPV-positiven Tumoren. (A) H-Score des C5a in Tumorzellen bei N0-Tumoren und N1+-Tumoren, p-Wert nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,0103$ . (B) H-Score des C5a nach N-Stadien, p-Wert nach Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,0898$ . (C) H-Score des C5a in Tumorzellen bei N0-Tumoren und N1+-Tumoren, p-Wert nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,1066$ . (D) H-Score des C5a in Tumorzellen nach N-Stadien, p-Wert nach Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,24$



**Abbildung 19.** Boxplots zur Darstellung der Anzahl der Immunzellen und des H-Scores von FH in Tumorzellen in Abhängigkeit vom N-Stadium bei p16-negativen Tumoren. (A) Anzahl der Immunzellen bei N0-Tumoren und N1+-Tumoren, p-Wert nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,3598$ . (B) H-Score des FH in Tumorzellen bei N0-Tumoren und N1+-Tumoren, p-Wert nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,5298$ . (C) Anzahl der Immunzellen nach N-Stadien, p-Wert nach Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,6128$ . (D) H-Score des FH in Tumorzellen nach N-Stadien, p-Wert nach Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,7031$ .

Die Analyse der p16-positiven Tumore ließ feststellen, dass Tumore mit Lymphknotenmetastasierung durch einen signifikant erhöhten H-Score des Faktor H gekennzeichnet waren (Abbildung 20). Darüber hinaus wiesen p16-positive Tumore mit Lymphknotenmetastasierung eine verringerte Immunzellzahl auf.

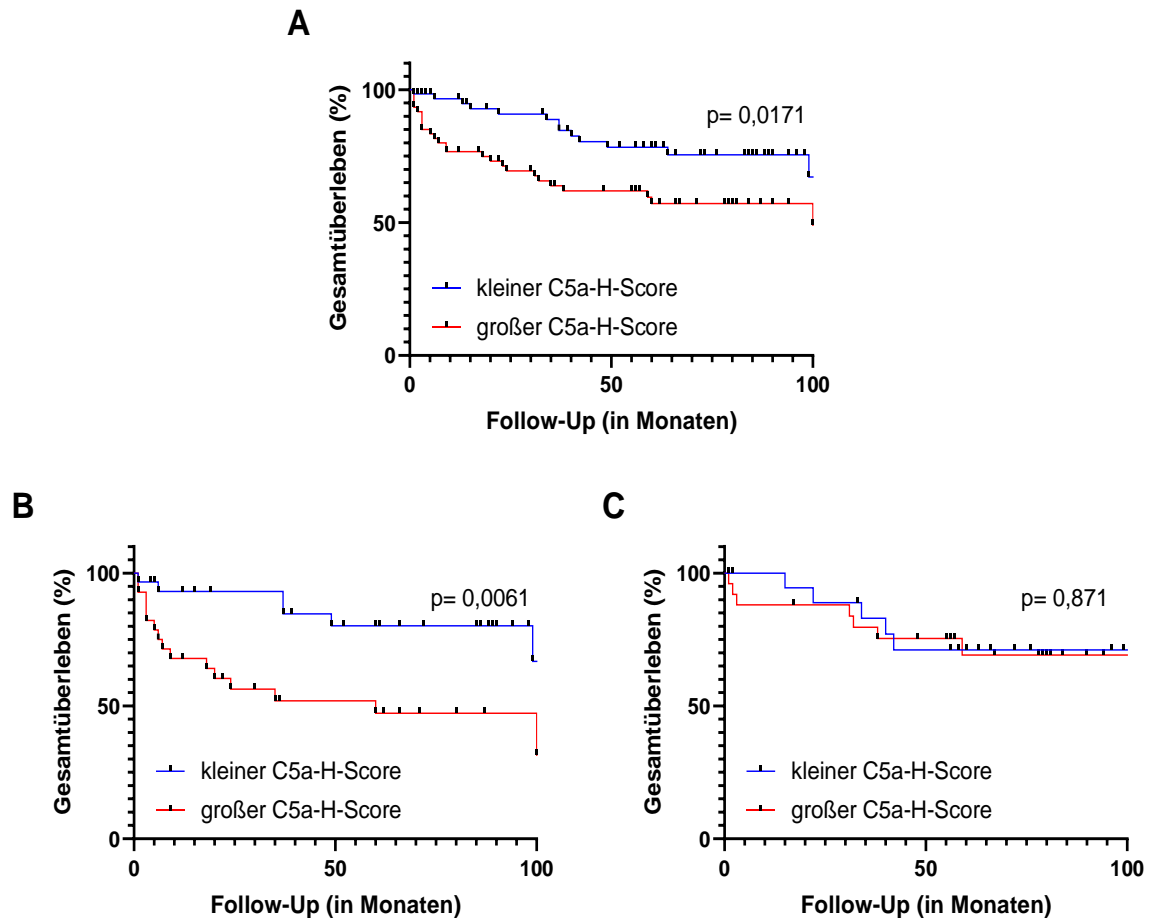
Unsere Beobachtungen zeigen, dass das Metastasierungspotential in die Lymphknoten bei HPV-positiven Tumoren im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren sowohl durch die Immunzellen als auch durch das Komplementsystem beeinflusst wird. Da der Faktor H ein Komplementinhibitor ist, könnte man schlussfolgern, dass der HPV-positive Tumor in die Lymphknoten metastasiert war, wenn die Immunaktivität in der Tumormikroumgebung abnahm.



**Abbildung 20.** Boxplots zur Darstellung der Anzahl der Immunzellen und des H-Scores von FH in Tumorzellen in Abhängigkeit vom N-Stadium bei p16-positiven Tumoren. (A) Anzahl der Immunzellen bei N0-Tumoren und N1+-Tumoren, p-Wert nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,012$ . (B) H-Score des FH in Tumorzellen bei N0-Tumoren und N1+-Tumoren, p-Wert nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,007$ . (C) Anzahl der Immunzellen nach N-Stadien, p-Wert nach Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,046$ . Zusätzlich p-Wert nach Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich einzelner N-Stadien. \*,  $\leq 0,05$ ; \*\*,  $\leq 0,01$ . (D) H-Score des FH in Tumorzellen nach N-Stadien, p-Wert nach Kruskal-Wallis-Test,  $p > 0,05$ .

Und erstaunlicherweise korrelierte das N-Stadium mit dem C5a-Tu-H-Score und mit dem FH-Tu-H-Score bei Rauchern mit positivem HPV-Status (p-Wert berechnet nach Spearman,  $p = 0,0058$  bei C5a,  $p = 0,02$  bei FH).

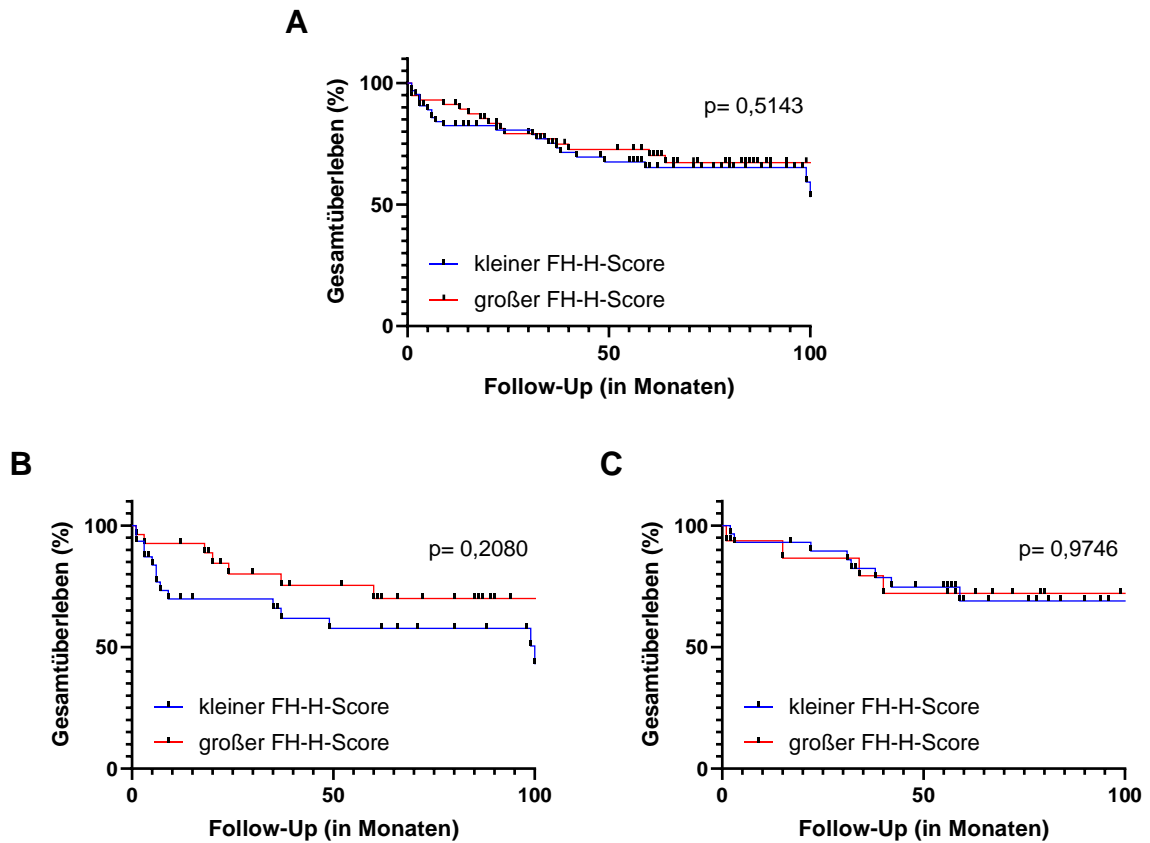
#### 4.6 Das Survival in Abhängigkeit von C5a, Faktor H und der Immunzellzahl



**Abbildung 21. Kaplan-Meier-Analysen zur Darstellung des OS in Abhängigkeit vom C5a-H-Score von Tumorzellen.** Einteilung der Patienten in zwei Gruppen, Schwellenwert ist der Mittelwert des C5a-H-Scores von Tumorzellen des gesamten Tumorkollektivs (=111,9). **(A)** Overall Survival von allen Patienten (n = 122), p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test, p = 0,0171. **(B)** Overall Survival von p16-negativen Patienten (n = 58), p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test, p = 0,0061. **(C)** Overall Survival von p16-positiven Patienten (n = 45), p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test, p = 0,871. P16-Status ist bei 19 Patienten unbekannt.

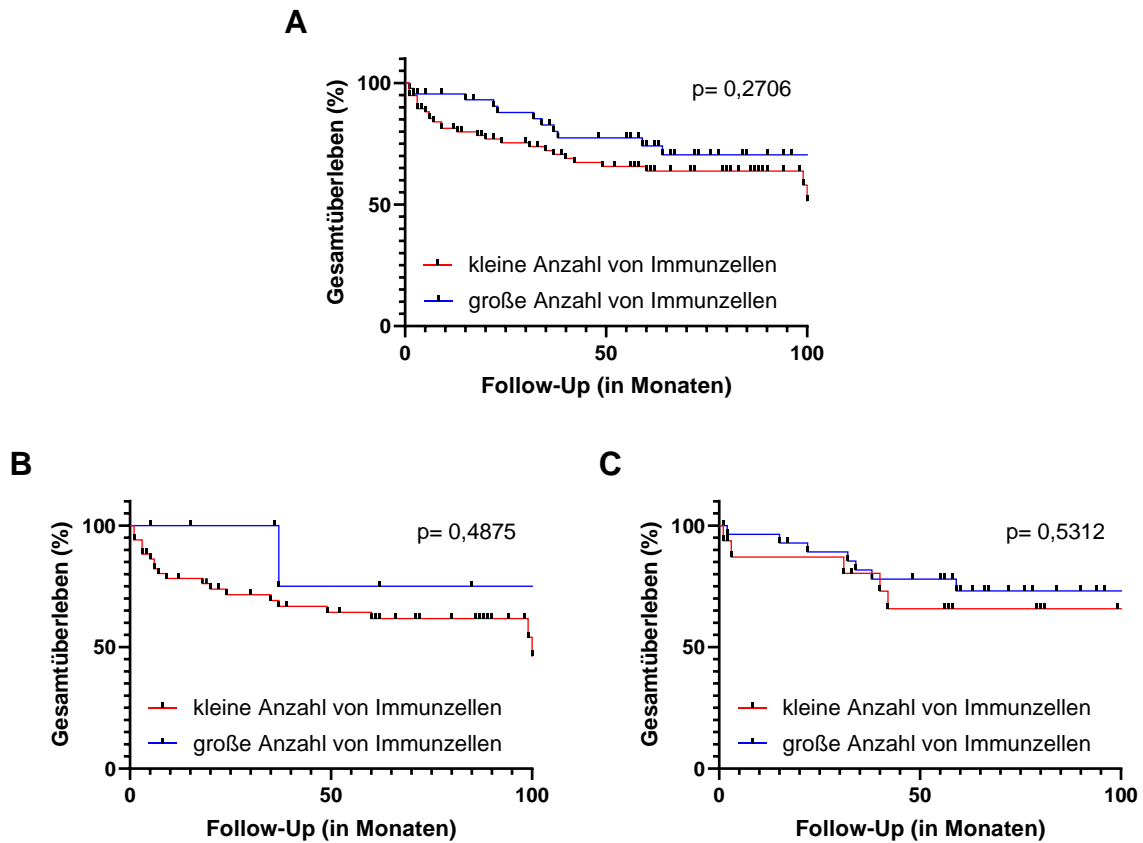
Es sollte überprüft werden, ob der Komplementfaktor C5a Einfluss auf das Survival von Patienten mit einem Oropharynxkarzinom hat. Als Schwellenwert wurde der Mittelwert der C5a-Tumor-H-Scores verwendet, der 111,9 betrug. Die Kaplan-Meier-Kurve der Patienten mit einem kleinen C5a-H-Score unterschied sich signifikant von den Patienten mit einem großen C5a-H-Score (p = 0,0171) (Abbildung 21). Teilte man das Kollektiv nach dem HPV-Status in zwei Gruppen auf, konnte ein Auseinanderklaffen der Kurven und eine Verringerung des p-Werts bei p16-negativen Patienten beobachtet werden. Anders verhielt sich die Analyse bei p16-positiven Patienten. Bei p16-positiven Patienten überlagerten sich die Kurven und der p-Wert betrug 0,871. Folglich war in unserem Kollektiv der erhöhte H-Score des Komplementfaktors C5a nur bei HPV-negativen Patienten ein Marker für ein schlechteres Survival.

## Ergebnisse



**Abbildung 22. Kaplan-Meier-Analysen zur Darstellung des OS in Abhängigkeit vom FH-H-Score von Tumorzellen.** Einteilung der Patienten in zwei Gruppen, Schwellenwert ist der Mittelwert des FH-H-Scores von Tumorzellen des gesamten Tumorkollektivs (=108,9). (A) Overall Survival von allen Patienten (n = 122), p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test,  $p = 0,5143$ . (B) Overall Survival von p16-negativen Patienten (n = 58), p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test,  $p = 0,2080$ . (C) Overall Survival von p16-positiven Patienten (n = 45), p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test,  $p = 0,9746$ . P16-Status ist bei 19 Patienten unbekannt.

## Ergebnisse



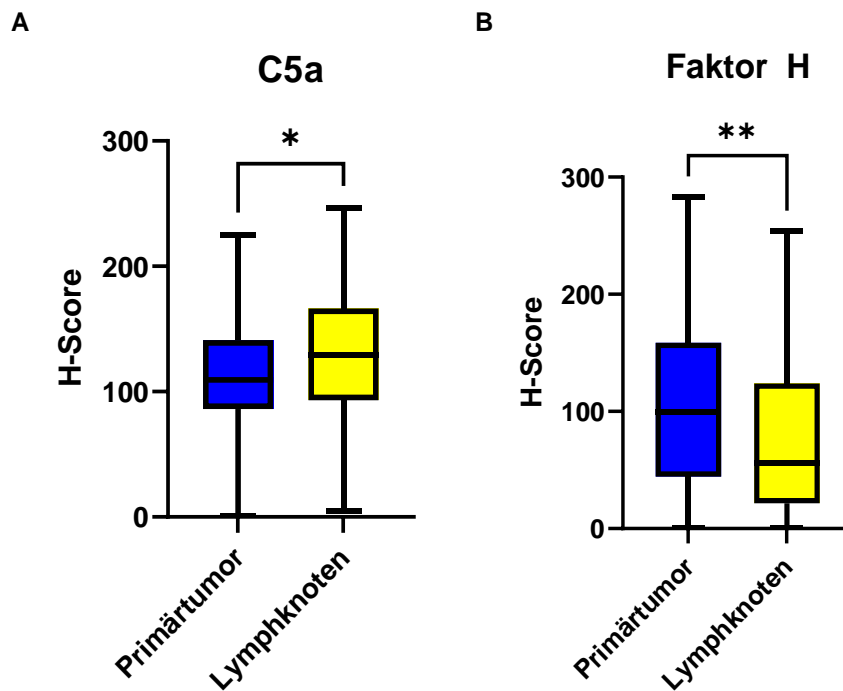
**Abbildung 23. Kaplan-Meier-Analysen zur Darstellung des OS in Abhängigkeit von der Immunzellzahl.** Einteilung der Patienten in zwei Gruppen, Schwellenwert ist der Mittelwert der Immunzellzahl des gesamten Tumorkollektivs (=2321,57). (A) Overall Survival von allen Patienten (n = 122), p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test, p = 0,2706. (B) Overall Survival von p16-negativen Patienten (n = 58), p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test, p = 0,4875. (C) Overall Survival von p16-positiven Patienten (n = 45), p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test, p = 0,5312. P16-Status ist bei 19 Patienten unbekannt.

Das Survival des Tumorkollektivs blieb vom H-Score des Faktor H und von der Immunzellzahl unbeeinflusst (Abbildung 22 und Abbildung 23). Dabei wurde für die Kaplan-Meier-Analyse der Mittelwert des jeweiligen Parameters des Tumorkollektivs gebildet. Der Mittelwert teilte das Kollektiv in zwei Gruppen ein.

Insgesamt deuten die Kaplan-Meier-Analysen der Patienten, bei denen das Oropharynxkarzinom diagnostiziert wurde, darauf hin, dass sich der Einfluss der Komplementaktivität und der Immunzellen auf das Survival von HPV-negativen und HPV-positiven Patienten anders gestaltet.

#### 4.7 Der Tabakkonsum beeinflusst neben dem Primärtumor auch die Lymphknotenmetastase

Neben dem Tumorkollektiv wurde auch das Kollektiv der Lymphknotenmetastasen analysiert. Dabei unterschieden sich die Färbungsintensitäten der Komplementkomponenten der Tumorzellen im Primärtumor von den Tumorzellen in der Lymphknotenmetastase. Im Vergleich zum Primärtumor war der H-Score des C5a von Tumorzellen in Lymphknotenmetastasen erhöht und der H-Score des Faktor H erniedrigt (Abbildung 24).



**Abbildung 24. Boxplots zum Vergleich des H-Scores von Tumorzellen in Abhängigkeit von der Lokalisation.** (A) H-Score des C5a von Tumorzellen des Primärtumors und der Lymphknotenmetastase. p-Wert berechnet nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,013$ . (B) H-Score des FH von Tumorzellen des Primärtumors und der Lymphknotenmetastase. p-Wert berechnet nach Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,002$ .

Die negative Korrelation zwischen dem Komplementfaktor C5a und dem Komplementinhibitor FH war, anders als im Primärtumor, nicht vorhanden (Abbildung 25).

Allerdings korrelierte der H-Score des Faktor H von Tumorzellen der Lymphknotenmetastase mit der Immunzellzahl der Lymphknotenmetastase (Abbildung 26).

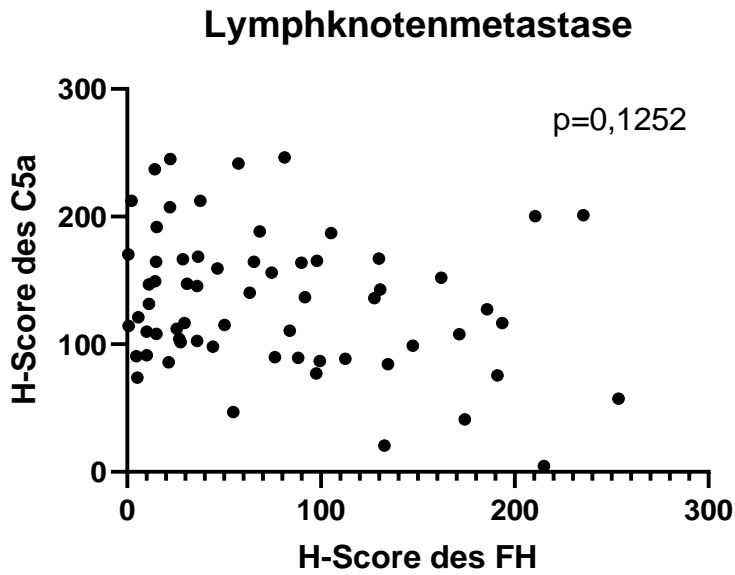


Abbildung 25. Scatterplot zur Darstellung des C5a-H-Scores gegen FH-H-Score von Tumorzellen der Lymphknotenmetastase. p-Wert berechnet nach Spearman,  $p = 0,1252$ .

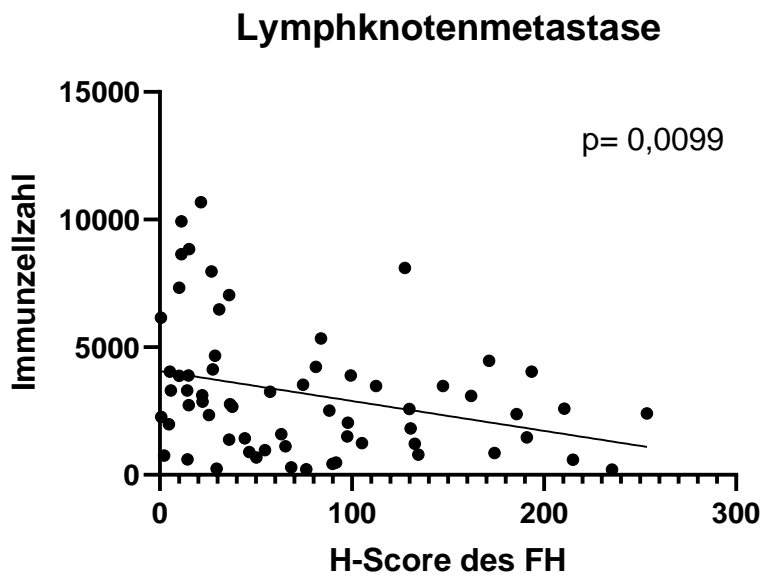


Abbildung 26. Scatterplot zur Darstellung der Immunzellzahl der Lymphknotenmetastase gegen FH-H-Score von Tumorzellen der Lymphknotenmetastase. p-Wert berechnet nach Spearman,  $p = 0,0099$ .

Das Survival bei Rauchern war erniedrigt.

Der Tabakkonsum war hierbei mit dem negativen HPV-Status, dem extrakapsulären Wachstum und einer erniedrigten Immunzellzahl im Lymphknoten assoziiert (Abbildung 28). Waren viele Immunzellen in der Lymphknotenmetastase vorhanden, war das Überleben des Patienten besser (Abbildung 27). Dennoch sei hier anzumerken, dass die Größe der Metastase innerhalb des Knotens die Immunzellzahl maßgeblich beeinflusst.

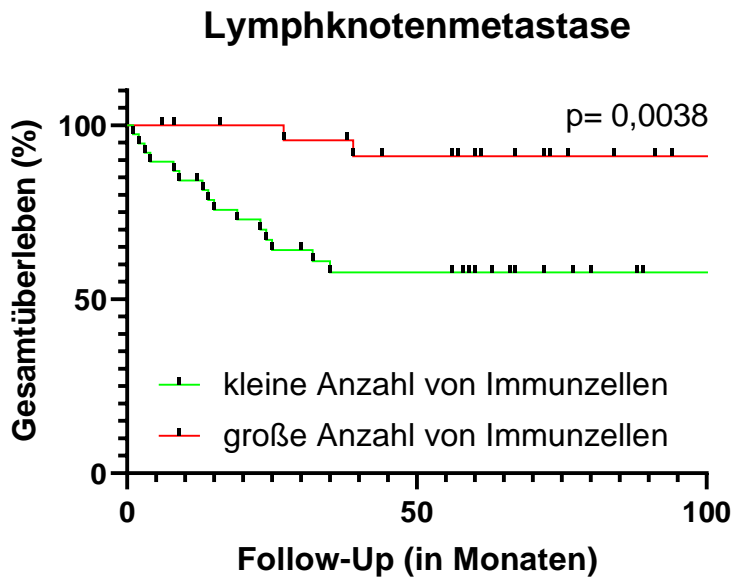


Abbildung 27. Kaplan-Meier-Analysen zur Darstellung des OS in Abhängigkeit von der Immunzellzahl in Lymphknotenmetastasen. Einteilung der Patienten in zwei Gruppen, Schwellenwert ist der Mittelwert der Immunzellzahl des Lymphknotenkollektivs (= 3176), (n = 64), p-Wert berechnet nach Log-Rank-Test, p = 0,0038.

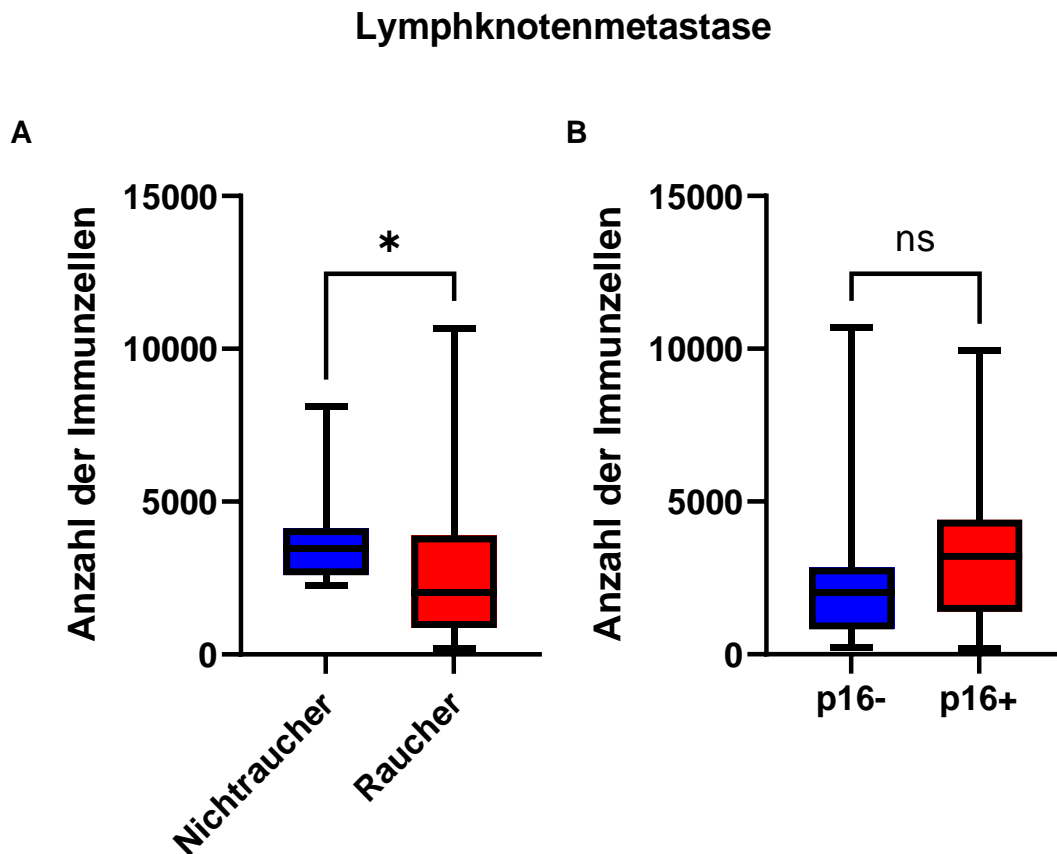


Abbildung 28. Boxplots zur Darstellung der Immunzellzahl in Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit vom Tabakkonsum und HPV-Status. (A) Tabakkonsum, p-Wert berechnet nach Mann-Whitney-U-Test, p = 0,0244 und (B) HPV-Status, p-Wert berechnet nach Mann-Whitney-U-Test, p = 0,0761.

## 5 Diskussion

Zahlreiche Studien belegen die Beteiligung des Immunsystems an der Krebsprogression. Das Immunsystem setzt sich aus dem angeborenen und erworbenen Immunsystem zusammen. Ein Vertreter des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem. Die Immunzellen sind zahlreich und werden je nach Typ zum angeborenen oder erworbenen Immunsystem gezählt. Das Komplementsystem wird als „zweischneidiges Schwert“ bezeichnet, da ihm sowohl die antitumorale als auch die protumorale Rolle zugesprochen wird [51]. Hierbei gibt es einerseits Studien, die abhängig von der Tumorlokalisation den Einfluss des Komplementsystems auf den Tumor einteilen. Andererseits unterstreichen viele Autoren, dass der Einfluss auf die Tumorprogression je nach Komplementkomponent unterschiedlich ist. Das betrifft auch die Immunzellen. Je nach Differenzierung der Immunzellen unterscheidet sich deren Einfluss auf den Tumor.

Die Charakterisierung des Oropharynxkarzinoms rückte in den letzten Jahren mehr in den Vordergrund, da die Inzidenz trotz rückläufigen Tabakkonsums ansteigend war. Große Veränderung erfuhr das Staging von Oropharynxkarzinomen in der 2017 aktualisierten 8. Auflage der des TNM-Klassifikationssystems der UICC/AJCC, da das HPV-assoziierte Oropharynxkarzinom als eigene Entität gewertet wird. Typisches Merkmal von HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen ist das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen bei der Erstvorstellung des Patienten. Dennoch zeigen HPV-positive Patienten ein deutlich besseres Survival im Vergleich zu den Patienten ohne HPV-Assoziation.

Diese Studie analysiert das Immunmilieu von HPV-positiven und HPV-negativen Oropharynx-tumoren. Gegenstand der Untersuchung waren die Anzahl von Immunzellen in unmittelbarer Tumorumgebung, die Konzentrationen von Komplementfaktor C5a und von den Komplementinhibitoren Faktor H und CD59 in den Tumorzellen. Es konnte eine voneinander abweichende Aktivität von Immunkomponenten zwischen HPV-positiven und -negativen Tumoren festgestellt werden. Dabei waren HPV-positive Tumore durch eine erhöhte Immunzellzahl und eine kleinere Konzentration von Faktor H gekennzeichnet.

Nahm die Immunzellzahl ab und stieg die Konzentration des Komplementinhibitors Faktor H, wies der HPV-positive Tumor Lymphknotenmetastasen auf. Das Survival von HPV-positiven Patienten blieb allerdings in dieser Studie von Faktor H und der Immunzellzahl unbeeinflusst – das Survival von HPV-positiven Patienten dieses Kollektivs war unabhängig vom N-Stadium nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation.

## Diskussion

Bei HPV-negativen Tumoren konnte ein signifikanter Einfluss des H-Scores des C5a auf das Überleben festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für das schlechtere Überleben bei p16-negativen Patienten mit einem hohen C5a-H-Score gab der Mittelwertvergleich des H-Scores abhängig vom N-Stadium. Die Patienten mit Lymphknotenmetastasierung wiesen einen erhöhten C5a-H-Score auf. Das Survival von HPV-negativen Patienten dieses Kollektivs war dabei abhängig vom N-Stadium nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation.

## **5.1 Einfluss des N-Stadiums auf das Survival bei HPV-negativen Tumoren und HPV-positiven Tumoren**

Das erhöhte N-Stadium galt lange Zeit bei Kopf-Hals-Karzinomen als negativer Prognosefaktor. Heute wird das HPV-assoziierte Oropharynxkarzinom als eigene Entität gewertet und beim Staging berücksichtigt. Weiterhin wird untersucht, welche Prognosefaktoren sich negativ auf das Survival von p16-negativen Patienten und p16-positiven Patienten auswirken. Die Studie „Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)“ untersuchte Oropharynxkarzinome, die zwischen 1997 und 2008 diagnostiziert wurden, und berichtet von einer Korrelation zwischen dem T-Stadium und dem Survival, die über den Zeitraum linear blieb. Im Vergleich dazu, sank der Einfluss des N-Stadiums auf das Survival über den Zeitraum [111] und sie führten diese Erscheinung auf den steigenden Anteil von HPV-assoziierten Tumoren zurück [111]. Amini et al. evaluierten die Prognosefaktoren für das Survival von Oropharynxkarzinomen der „National Cancer Data Base (NCDB)“ und bestätigten den verringerten Einfluss des N-Stadiums auf das Survival von HPV-positiven Tumoren. Ferner machte die Gruppe die Beobachtung, dass die extrakapsuläre Extension mit einer Verschlechterung des Survivals bei HPV-negativen Oropharynxkarzinomen, aber nicht bei HPV-positiven OPSCC assoziiert war [111].

Konträr dazu, konnten Maxwell et al. den Einfluss der extrakapsulären Extension auf das Survival weder bei HPV-negativen noch bei HPV-positiven Tumoren feststellen [111]. Sie schlugen die Anzahl der Lymphknotenmetastasen als ausschlaggebenderen Prognosefaktor vor. Der sogenannte Lymph node ratio (LNR) ist der Quotient aus der Anzahl befallener Lymphknoten und der Anzahl entnommener Lymphknoten und erlangt bereits Bedeutung als Prognosefaktor bei verschiedenen Tumorarten, wie beispielsweise bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle [112]. Unter anderem diente der LNR mit einem Cut-off Wert von 10 % in der Studie von Jacobi et al., im Gegensatz zu HPV-negativen OPSCC, als Prognosefaktor bei HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen, so dass der LNR zur Verbesserung der Risikostratifikation zusätzlich zur 8. Auflage des TNM-Klassifikationssystems der UICC/AJCC vorgeschlagen wurde [112]. Sie fügten aber auch hinzu, dass der LNR stark interinstitutionell abweicht, da die Anzahl der entnommenen Lymphknoten abhängig vom Behandlungskonzept der Neck Dissection des Instituts ist.

Dennoch gibt es kaum Ansätze, die versuchen, den verringerten Einfluss des N-Stadiums auf das Survival von HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen zu erklären. Ziel unseres Projekts war es, Unterschiede im Immunsystem zwischen HPV-positiven und -negativen Tumoren aufzudecken, um zu analysieren, ob sie auch im Zusammenhang zum N-Stadium stehen.

## 5.2 Immunzellzahl und FH-H-Score variiert abhängig vom HPV-Status

Die Ergebnisse zeigen eine erhöhte Immunzellzahl bei HPV-positiven Tumoren. Zur Bestimmung der Anzahl der Immunzellen verwendeten wir das QuPath-0.2.0. Es wurden in etwa 100 Annotationen jeweils in den einzelnen TMAs eingezeichnet, so dass ein „Classifier“ zur Einteilung der Zellen nach ihrer Zellart trainiert werden konnte. Die Bestimmung der Anzahl der Immunzellen anhand der immunhistochemisch gefärbten Cores war zu ungenau, da stark gefärbte Immunzellen als Zelle in unseren Scans nicht erkannt werden konnten. Aus diesem Grund entschieden wir uns, diese Analyse mithilfe von HE-Cores durchzuführen.

In den bisherigen Studien wurde die Bestimmung der Immunzellzahl meistens von zwei Pathologen unter Vergrößerung getrennt durchgeführt. Das Ergebnis war eine Einteilung der Tumore in Gruppen geringer, moderater und starker Immuninfiltration. Das Verwenden eines Programms brachte den Vorteil, dass eine objektivere Bestimmung der Immunzellzahl möglich war. Außerdem gab das Programm eine absolute Zahl heraus. Die metrische Skala hat im Gegensatz zur Ordinalskala den Vorteil, dass die Differenz der Immunzellen zwischen zwei Vergleichsgruppen berechnet werden kann.

Unsere Ergebnisse lassen sich durch Ward et al. bestätigen. Sie konnten sehen, dass 85 % aller HPV-positiven Oropharynxtumore einen hohen oder moderaten Level an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) aufwiesen und demonstrierten eine Korrelation zwischen dem TIL-Spiegel und dem HPV-Status. Ferner richteten sie ihren Fokus auf HPV-positive OPSCC und bemerkten ein mit steigendem TIL-Level zunehmendes Survival. Außerdem beobachteten sie, dass HPV-positive Tumore mit geringer Immuninfiltration ein vergleichbares Survival zeigten wie HPV-negative Tumore. Bei HPV-negativen Tumoren konnten sie keine Assoziation des TIL-Levels mit dem Survival beobachten [14].

Mito et al. befassten sich mit Genexpressionsdatenbasen wie „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA), um das Immunprofil des TME von Kopf-Hals-Tumoren zu studieren. Sie teilten die Kopf-Hals-Tumore in drei Immunsignaturen ein. Sie bezeichneten sie als kalt, Lymphozytensignatur und myeloische-/dendritische Zellen-Signatur. Diese Gruppe konnte eine Hochregulation des Komplementsystems und eine Assoziation mit dem HPV-Status bei der Lymphozytensignatur beobachten. [113].

Des Weiteren berichten auch Gameiro et al. vom „einzigartigen Immunphänotyp“ bei HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren, bei denen eine hohe Immuninfiltration, hohe T-Zellaktivierung und ein hoher Spiegel an immunregulatorischen Einflüssen vorlag [25]. Gründe für die erhöhte Immunzellzahl könnte auf die Abwehrreaktion des Körpers auf das Virus zurückzuführen sein.

In vielen Studien konnten Epitope spezifisch für E2, E5 und E6 HPV-Proteine auf CD8+ T-Zellen bei HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren entdeckt werden [25, 114].

Im Review von Saber et al. werden Studien zu tumorbezogenen Wirkungen der verschiedenen tumorinfiltrierenden Lymphozyten in HPV-positiven Tumoren beschrieben [82] und zusammengefasst, dass eine hohe Zahl an CD8+ T-Zellen und ein geringer CD4/CD8-Quotient mit einem besseren Outcome zusammengehen. Bei ausbleibender Unterscheidung des T-Zell-Phänotyps, in anderen Worten durch alleinige Detektion der T-Zellen mit dem CD3, der auf allen T-Zellen vorhanden ist, konnte kein signifikanter Unterschied im Survival ermittelt werden. Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse dieser Studie sollten weitere Studien durchgeführt werden, bei denen die Immunzellen differenziert analysiert werden. Wir schlagen vor, die Immunzellen in lymphatische und myeloische Zellen, und anschließend nach ihrem CD zu unterteilen.

Neben der erhöhten Immunzellzahl war der H-Score des Faktor H bei HPV-positiven Tumoren verringert ( $p = 0,0248$ , Mann-Whitney-U-Test).

Zur Untersuchung der Konzentration des Faktor H färbten wir die TMAs mit dem Antikörper OX-24 an. Der Antikörper OX-24 detektiert neben Faktor H auch das Faktor H-ähnliche Protein, FHL-1, ein Produkt des alternativen Spleißens. Daugan et al. färbten die Schnitte mit weiteren Antikörpern an, die die Unterscheidung zu FHL-1 ermöglichte. Dabei verwendeten sie zusätzliche FH-Antikörper, wie das „N terminal-specific antibody Quidel 2 (Quidel, catalog no. A254)“, „C18 (Abcam, catalog no. ab121055)“ und „L20 (Thermo Fisher Scientific, catalog no. GAU-020-03-02)“, die den C-Terminus erkennen, der nicht bei FHL-1 vorhanden ist [106]. Es gibt Studien, die dem FHL-1 eine von FH abweichende Funktion zusprechen. Aus diesem Grund sollte die Färbung der in diesem Versuch verwendeten TMAs mit weiteren Antikörpern zur Unterscheidung zum FHL-1 in Betracht gezogen werden.

Erstaunlicherweise waren Reviews bezüglich des Faktor H und des humanen Papillomvirus nur in sehr begrenzter Zahl vorhanden. Deswegen wurde versucht, auf indirektem Weg Hinweise auf die Wechselwirkung zwischen der Faktor H-Konzentration und dem HPV zu finden. Reviews über das Verhältnis zwischen dem HPV und der Komplementaktivität wurden zunächst durchsucht, da der Faktor H ein Komplementinhibitor ist. Es gibt Anzeichen, dass das humane Papillomvirus die Komplementaktivität beeinflusst, aber dieses Gebiet ist auch noch vergleichsweise unerforscht [115]. Canales et al. untersuchten Seren von Patientinnen, bei denen die CIN III festgestellt wurde und gleichzeitig ein positiver HPV-Status vorlag und beobachteten eine im Vergleich zu HPV-negativen und gesunden Patientinnen erhöhte Expression von C3 [116]. Ähnlich war auch das Ergebnis von Pulay et al., bei dem die C3-Konzentration mit

Progression des Zervixkarzinoms bis zum Stadium III ansteigend war, die aber bei Stadium IV abnahm [116]. Mit der fraglichen Annahme, dass C3 die Komplementaktivität wiedergibt, könnte man schlussfolgern, dass HPV-assoziierte Tumore zumindest in frühen Stadien eine erhöhte Komplementaktivität aufweisen. Somit würden diese Ergebnisse nicht den Ergebnissen unserer Arbeit widersprechen. Allerdings ist zu erwähnen, dass die von unserem Versuch abweichende Lokalisation nicht vernachlässigt werden sollte. Außerdem bildeten im Versuch von Pulay et al. gesunde HPV-negativ Diagnostizierte die Kontrollgruppe, wohingegen bei unserer Arbeit zwar in Bezug zum HPV-Status negativ Diagnostizierte, aber Patienten, bei denen ein Tumor diagnostiziert wurde, die Kontrollgruppe bildeten. Zuletzt ist noch zu erwähnen, dass dem Komplementprotein C3 Funktionen zugesprochen werden, die das C3 als Marker für die Komplementaktivität fragwürdig erscheinen lassen. Dickinson et al. suchten nach Biomarkern zur Differenzierung zwischen HPV-positiven und -negativen Tumoren, da allein mit dem p16-Protein einige Tumore in Bezug auf den HPV-Status falsch positiv detektiert werden. Erstaunlicherweise gelingt die Differenzierung mithilfe des Komplementproteins C7. Dabei gingen erhöhte Konzentration an C7 eher mit HPV-Positivität einher [117].

Als anderen Ansatzpunkt für die Erklärung des verringerten FH-H-Scores bei HPV-positiven Tumoren bildete das Interferon- $\gamma$ . Studien belegen, dass die Expression des Faktor H über das Interferon- $\gamma$  während einer Inflammation hochreguliert wird [60]. Dem anzuknüpfen sind die Follow-up-Evaluationen von Song et al. von Patienten mit einem Zervixkarzinom, die zeigen, dass der IFN- $\gamma$ -positive Status signifikant mit der Clearance von high-risk HPV assoziiert ist [118]. Diese Studien könnten die Beobachtungen, dass HPV-positive Patienten einen im Vergleich zu HPV-negativen Patienten verringerten FH-H-Score aufwiesen, erklären.

Demgegenüber steht die Studie von Lin et al., die die Beziehung zwischen der Immunantwort, dem Tabakkonsum, dem HPV-Status und der Prognose untersuchten. Sie schlagen vor, dass der positive HPV-Status möglicherweise mit erhöhter Anzahl an T-Helfer-Zellen vom Typ1 und einer erniedrigten Anzahl an T-Helfer-Zellen vom Typ2 und damit mit einer besseren Prognose assoziiert ist, während der Tabakkonsum das Gegenteil bewirkt. Die immunhistochemische Färbungsanalyse zeigte dabei bei p16-positiven Oropharynxkarzinomen erhöhte Färbungsintensität von Zytokinen, wie das Interferon- $\gamma$  [119].

Nachdem die Tumore auf die Immunzellzahl und den Faktor H getrennt untersucht wurden, wurde analysiert, ob diese Komponenten des Immunsystems im Zusammenhang stehen. Die Immunzellzahl der Cores von Oropharynxkarzinomen korrelierte negativ mit dem H-Score des Faktor H (Spearman,  $p = 0,002$ ). Das Komplementsystem ist nicht nur Bestandteil des angebo-

renen Immunsystems. Es beeinflusst auch das adaptive Immunsystem. Es ist bekannt, dass Faktor H den alternativen Weg des Komplementsystems hemmt. Erstaunlicherweise konnte bei dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen dem H-Score des C5a in Tumorzellen und der Immunzellzahl festgestellt werden.

Smolag et al. konnten anhand von Brusttumorzellen in-vitro zeigen, dass Faktor H das Überleben von CD14+ Makrophagen beeinflusst und deren Differenzierung zu immunsuppressiven Makrophagen im Gewebe fördert. Zudem exprimierten die Faktor H-induzierten Makrophagen höhere Konzentrationen von PD-L1, das zur reduzierten T-Zellaktivierung führte [120].

Daugan et al. zeigten in ihrer Studie mit Tumorzellen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (ccRCC) und des Adenokarzinoms der Lunge, dass die Färbungsanalyse des intrazellulären Faktor H von der membranengebundenen Faktor H getrennt durchgeführt werden sollte. Nur der Faktor H im Zytoplasma der Tumorzelle war mit einem verringerten Survival assoziiert. Dennoch konnte er keine Assoziation zwischen der membranengebundenen oder intrazellulären Faktor H-Konzentration und dem Immuninfiltrat beobachten [106].

Der H-Score des Faktor H in Tumorzellen korrelierte daneben negativ mit dem H-Score des C5a in den Tumorzellen ( $p \approx 0,0016$ , Spearman). Der Faktor H ist ein wichtiger löslicher Komplementinhibitor. Aus diesem Grund ist es sehr naheliegend, dass sich die Konzentrationen der Proteine gegenläufig verhalten. Obwohl das Komplementprotein C5a bei Tumorpatienten, anders als bei Gesunden, weitere Funktionen einnimmt, scheint seine Regulation durch den Faktor H noch gegeben zu sein.

Ajona et al. hemmten bei humanen NSCLC-Zellen die Aktivität des Faktor H mithilfe eines neutralisierenden Antikörpers und konnten eine erhöhte C5a-Freisetzung nachweisen [70].

Es wird sogar von einer Interaktion zwischen PTX3, C1q und Faktor H berichtet, die in einer verringerten Angiogenese, Makrophageninfiltration und verringerten C5a-Produktion resultiert [41].

### **5.3 Immunzellzahl und FH-H-Score variiert abhängig vom Tabakkonsum**

Multiple Studien berichten über Veränderungen der Tumormikroumgebung durch den Tabakkonsum. Wilde et al. sind der Meinung, dass die Einteilung der Oropharynxkarzinome nur auf Basis des HPV-Status im Hinblick auf das Outcome zum Scheitern verurteilt ist. Die Gruppe schlägt vor, intrinsische Tumormerkmale wie die p16-Expression oder den „Tumor multinucleation index (MuNI)“ mit Merkmalen der Tumormikroumgebung wie die Anzahl an Tumordinfiltrierenden Lymphozyten zu kombinieren. Zudem zeigte seine Studie, dass der Tabakkonsum mit einer Reduktion von CD8+ Tumordinfiltrierenden Lymphozyten von in etwa 40 % bei p16-positiven Oropharynxkarzinomen assoziiert ist. Er fügt hinzu, dass HPV-positive Nichtraucher das beste Outcome bei dem Oropharynxkarzinom haben [121].

Mandal et al. untersuchten Immunzellen von Kopf-Hals-Tumoren anhand einer Analyse von Daten des „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) und zeigten, dass das Rauchen mit einer geringeren Immuninfiltration einherging, das mit einem schlechteren Survival assoziiert war [122].

Möglicherweise verhält sich das HPV-negative Oropharynxkarzinom ähnlich wie das Lungenkarzinom, da sie den Risikofaktor Tabakkonsum gemeinsam haben. Es gibt zahlreiche Studien, die auf eine erhöhte Konzentration des Faktor H bei Lungentumoren hinweisen. Ajona et al. gelang die Hemmung des Komplementinhibitors Faktor H in Tumorzellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms und die Gruppe beobachtete eine erhöhte Freisetzung von C5a und ein geringeres Tumorstadium bei Faktor H-defizienten Mäusen, dass sie die Hypothese aufstellten, dass Tumorzellen möglicherweise durch Faktor H vor dem Komplement geschützt sind [70]. Pio et al. untersuchten das Sputum von Patienten, bei denen ein Lungentumor diagnostiziert wurde, und stellten fest, dass der Faktor H erhöht vorliegt und schlug ihn als möglichen Biomarker vor [123].

Auch in unserem Versuch wiesen Raucher eine im Vergleich zu Nichtrauchern erniedrigte Immunzellzahl im Tumor und einen erhöhten FH-H-Score von Tumorzellen auf. Dennoch ist das Ergebnis mit Vorsicht zu betrachten, da der HPV-Status und der Tabakkonsum in unserem Kollektiv negativ miteinander korrelierten.

#### **5.4 Bei $N > 0$ Tumoren verändern sich die Konzentrationen von Komponenten des Immunsystems abhängig vom HPV-Status**

Unterschiede in der Aktivität der Komponenten des Immunsystems legten nahe, dass eine getrennte Untersuchung der HPV-positiven und-negativen Tumore nötig ist. Die bisherigen Studien weisen auf eine im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren erhöhte Immunaktivität in HPV-positiven Tumoren hin. Auch ist bekannt, dass HPV-positive Tumore bei der Erstdiagnose häufig Lymphknotenmetastasen aufweisen, die Patienten dennoch ein besseres Überleben haben. Wir konnten zeigen, dass sich die Konzentration der Komponenten des Immunsystems bei Oropharynx Tumoren mit Lymphknotenmetastasen verändert. Abhängig vom HPV-Status waren andere Komponenten des Immunsystems betroffen.

Die Tumore ohne HPV-Assoziation hatten in unserem Projekt im N0-Stadium eine im Vergleich zu den Tumoren, die bereits Lymphknotenmetastasen aufwiesen, einen geringeren H-Score des Komplementfaktors C5a. Ajona et al. fassen in ihrem Review die Schritte der Metastasierung zusammen. Die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und der Verlust der Zelladhäsion gehören zu den frühen Schritten der Metastasierung. Durch Inhibition des C5aR1 würde die Beeinträchtigung der Migration, die Hochregulation der Expression von E-Cadherin, die Suppression der EMT und der Invasivität gelingen. Außerdem soll C5a an der Degradation der Proteine der extrazellulären Matrix über Matrix-Metalloproteinasen beteiligt sein. Das Anaphylatoxin C5a kommt erhöht im Plasma von Patienten vor, die an Lungenkrebs erkrankt sind, und ist mit erhöhtem Metastasierungsrisiko assoziiert [57].

Cai et al. untersuchten die Funktion des C5a im Nasopharynxkarzinom. Der Nasopharynx befindet sich topografisch in unmittelbarer Nähe des Oropharynx, dennoch weist er Unterschiede auf histologischer Ebene zum Oropharynx auf. Deshalb sollte die Funktion des C5a im Nasopharynx nicht zweifelsfrei auf den Oropharynx übertragen werden. Die in-vitro Untersuchungen mit Tumorzellen des Nasopharynxkarzinoms zeigten eine erhöhte Proliferation bei Stimulation mit C5a. Ferner war die STAT3-Acetylierung bei Stimulation mit C5a verstärkt. Die Signaltransduktoren und -aktivatoren (STAT) sind Transkriptionsfaktoren, die sich über den JAK-STAT-Signalweg an der Proliferation, Differenzierung, Apoptose von Zellen und an der Regulation der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr beteiligen. Die Hyperaktivierung des STAT3-Proteins steht im Zusammenhang mit einer Vielzahl von malignen Tumoren und ist mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert. Die Hyperaktivierung des STAT3-Proteins soll dabei nicht nur die Tumorzellen, sondern auch Immunzellen der Tumormikroumgebung betreffen. Beispielsweise soll sich infolge der Hyperaktivierung von STAT3-

Proteinen ein immunsuppressives Milieu durch Aktivierung von Tumor-assoziierten Fibroblasten (CAFs), Inhibition von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und durch verbessertes Survival von myeloischen Suppressorzellen (MDSCs) bilden. Über die CAFs soll die Extrazellulärmatrix modifiziert werden, dass die Angiogenese und Metastasierung unterstützt wird [125]. Die Inhibition des C5aR1 erhöhte auch die Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in prämetastatische Nischen, so dass die Metastasierung beeinträchtigt wurde [57]. Wie bereits erwähnt, konnten Imamura et al. bei Tumorschnitten von Patienten mit Brustkrebs, vor allem aber bei triple-negativen Tumoren, beobachten, dass eine erhöhte Konzentration an C5a-Rezeptoren mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen assoziiert war [58]. Vor diesem Hintergrund wurden Tumorzellen in Lymphknotenmetastasen auf C5a-Rezeptoren untersucht. Dabei waren mehr als die Hälfte (55 %) der untersuchten Lymphknotenmetastasen positiv bezüglich des Vorhandenseins der C5a-Rezeptoren. Erstaunlicherweise waren C5aR-positive Lymphknotenmetastasen vorhanden, bei denen der Primärtumor C5aR-negativ war, so dass spekuliert werden konnte, dass möglicherweise diese Konversion die Lymphknotenmetastasierung erleichtert [58].

Im Kontrast zu HPV-negativen Tumoren, war bei HPV-positiven Tumoren eine Assoziation der erniedrigten Immunzellzahl und des erhöhten FH-H-Scores mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen erkenntlich ( $p \approx 0,012$ , Mann-Whitney-U-Test).

Trotz anderen Tumortyps, ist auch die Studie von Piersma et al. zu nennen. Sie beschäftigten sich mit dem HPV-induzierten Zervixkarzinom und konnten feststellen, dass Tumore mit einer starken CD8<sup>+</sup>T-Zellinfiltration, und einem großen CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Zell-Quotienten mit dem Fehlen einer Lymphknotenmetastase assoziiert waren [126, 127]. Bei Patienten ohne Nachweis von zirkulierenden HPV-spezifischen T-Zellen, hatte die Stärke der T-Zellinfiltration keinen Einfluss auf die Lymphknotenmetastasierung [127].

Demgegenüber steht die Studie von Ward et al., bei dem keine Assoziation zwischen dem TIL-Level und der N-Klassifizierung bei HPV-positiven Oropharynx Tumoren festgestellt wurde. Interessanterweise konnten sie feststellen, dass bei HPV-positiven Tumoren im Gegensatz zu HPV-negativen Tumoren, die Zahl der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten mit dem besseren Survival assoziiert war [14]. Durch Differenzierung der Immunzellen nach ihrem Phänotyp wird eine genauere Analyse des Zusammenhangs gelingen. Denn während CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Studie von Piersma et al. bei Tumoren ohne Lymphknotenmetastasierung erhöht war, konnten keine Unterschiede bei NK-Zellen beispielsweise beobachtet werden.

Auch der H-Score des Faktor H von Tumorzellen war mit dem positiven N-Stadium assoziiert ( $p \approx 0,007$ , Mann-Whitney-U-Test). Möglicherweise ist das erhöhte Vorkommen von Faktor H

bei fortgeschritteneren Tumoren auf einen Evasionsmechanismus des HPV oder der Tumorzellen zurückzuführen. In der Studie von Wilczek et al. war die Expression des Faktor H in Fernmetastasen in der Leber höher als im Primärtumor, dem Kolorektalkarzinom [69], woraus sie schließen konnten, dass möglicherweise Faktor H an Tumorinvasionsmechanismen beteiligt ist. Auch Riihilä et al. konnten anhand von csCC-Zellkulturen und mittels TMAs zeigen, dass die Expression des Faktor H, dessen Produktion mithilfe von Interferon- $\gamma$  hochreguliert werden konnte, mit steigender Progression in-vivo zunahm und der Faktor H wahrscheinlich die Proliferation und Migration der Tumorzellen fördert [66]. Bussu et al. untersuchten Seren von Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom und beobachteten einen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöhten IFN- $\gamma$ -Spiegel. Außerdem konnten sie allerdings feststellen, dass der geringe IFN- $\gamma$ -Spiegel mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen assoziiert war [128]. Trifft die Regulation der Expression des Faktor H über das IFN- $\gamma$  in unserem Kollektiv zu, würde dieses Ergebnis nur partiell unseren Beobachtungen entsprechen. In unserem Versuch war der FH-H-Score bei HPV-positiven Patienten verringert. HPV-assoziierte Tumore sind durch eine erhöhte Bereitschaft zur Lymphknotenmetastasierung gekennzeichnet. Dennoch machten wir bei selektiver Untersuchung von HPV-positiven Tumoren die Beobachtung, dass der erhöhte FH-H-Score mit Lymphknotenmetastasierung assoziiert war.

Chu et al. analysierten Speichelproben von Patienten, bei denen das orale Plattenepithelkarzinom diagnostiziert wurde, mittels Massenspektrometrie und ELISA und stellten fest, dass Faktor H im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht war ( $p < 0,001$ ). Dabei war die Faktor H-Konzentration bereits im frühen Stadium erhöht. Daneben war die Faktor H-Konzentration bei Patienten, die mindestens eine Lymphknotenmetastase aufwiesen, im Vergleich zu Patienten ohne Lymphknotenmetastasierung signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ). Interessanterweise konnte keine Korrelation zwischen der Faktor H-Konzentration und dem Alkoholkonsum, dem Zigarettenkonsum, der Zelldifferenzierung und dem Alter festgestellt werden [129].

Bushey et al. ist es gelungen, den Faktor H in Exosomen von verschiedenen Tumorzelllinien, unter anderem vom Lungentumor, nachzuweisen und fanden heraus, dass die Konzentration von Exosomen, die auch Faktor H beinhalteten, mit einem erhöhten Metastasierungspotential korrelierte. Durch Blockade der Funktion des FH mittels humanen anti-FH Antikörpers GT103 war die Lyse von Exosomen aus dem Plasma von Patienten mit metastasiertem Lungentumor erhöht. Folglich schlussfolgerten sie, dass der Faktor H die Exosomen vor der Komplementvermittelten Zytotoxizität (CDC) und Phagozytose schützte [130].

Im Kontrast dazu steht die Studie von Smolag et al., die Brusttumorschnitte immunhistochemisch anfärbte und keine Korrelation zwischen der Färbungsintensität von FH und dem N-Stadium beobachten konnte [120].

## 5.5 C5a und das Survival

Der erhöhte H-Score des C5a von Tumorzellen war mit einem schlechteren Survival assoziiert (Log-Rank-Test,  $p \approx 0,0171$ ).

Wie von vielen Autoren bereits beschrieben, ist die Funktion des C5a janusköpflich. Heute geht man vielmehr davon aus, dass das Anaphylatoxin C5a protumoral wirkt und somit sowohl das Tumorwachstum als auch die Metastasierung fördert [131]. Eine erhöhte Konzentration von C5a oder C5aR1 konnte man beispielsweise bei Lungentumoren, Magentumoren, Ovarialtumoren, Brusttumoren und Urotheliumtumoren erkennen [57]. Die Aktivierung des C5aR1, der in der Membran von Lymphozyten, Makrophagen, myeloischen Zellen, hämatopoietischen Stammzellen, Mesenchymzellen, Epithelzellen und Tumorzellen auffindbar ist, bewirkt eine antiapoptotische Antwort [131]. Markiewski et al. konnten mithilfe von Mäusen, in denen Tumorzellen implantiert wurden, den protumoralen Effekt des C5aR bestätigen und zeigen, dass C5a chemotaktisch auf MDSCs wirkt und, dass über die Produktion von immunsuppressiven reaktiven Oxygenspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) der MDSCs die CD8+TIL-Funktion supprimiert wird [132]. Bei der Analyse von Transkriptomen von Kopf-Hals-Karzinomen, die von der TCGA bereitgestellt wurden, konnten Gadwa et al. beobachten, dass eine erhöhte Expression von C5aR1 eine Tendenz zur Assoziation mit reduziertem Overall Survival zeigte [133]. Yang et al. untersuchten die Beziehung zwischen der Expression von C5a und dem klinischen Outcome anhand von Tissue Mikroarrays von Patienten, bei denen ein metastasiertes Nierenzellkarzinom diagnostiziert wurde. Diese Gruppe zeigte mithilfe einer Kaplan-Meier-Analyse die negative Korrelation zwischen der Expression von C5a und dem Gesamtüberleben und dem Progressionsfreien Überleben und führte multivariate Analysen durch, wodurch sie die Expression von C5a als möglichen prognostischen Faktor sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das Progressionsfreie Überleben aufzeigen konnten. Als möglichen Grund erwähnte sie die Förderung der EMT und der Expression PD-1/PD-L1 durch das C5a [96]. Cai et al. konnten in seiner in-vitro Studie darstellen, dass C5a das Tumorwachstum bei nasopharyngealen Tumorzellen fördert [134]. Tumorzellen erlangen die Resistenz gegenüber der Komplement-vermittelten Lyse [35] über verschiedene Komplementinhibitoren, weshalb viele Autoren die antitumorale Rolle des Komplementsystems nur als limitiert sehen.

Im Kontrast dazu, konnten Gadwa et al. mithilfe von HNSCC-Mausmodellen ein erhöhtes Tumorwachstum bei Inhibition der Komplementrezeptoren C3aR und C5aR feststellen. Auch konnten sie damit verbunden, eine Konversion von CD4+ T-Zellen in CD4+Foxp3+Tregs nachweisen [133]. Das widerspricht den Beobachtungen der bisher bekannten Literatur. Auch Kim

et al. zeigten anhand eines murinen Mamma-CA-Modells, dass C5a-exprimierende Tumore zunächst ein verringertes Tumorwachstum aufwiesen und schlussfolgerten daraus, dass möglicherweise das C5a zur antitumoralen Immunität beitrug. Dennoch machten sie die Beobachtung, dass nach einer bestimmten Dauer des Versuchs der Tumor, anders als erwartet, größer wurde und das C5a die Tumorprogression förderte [135].

## 5.6 Limitationen durch die Versuchsdurchführung

Zuallererst ist zu erwähnen, dass eine Limitation durch die „single-institution cohort“ gegeben ist.

Bezüglich der Patientendaten ist hinzuzufügen, dass die Detektion des p16 zur Diagnose des HPV von manchen Autoren, wie im vorausgegangenen Kapitel beschrieben, als unzureichend angesehen wird.

Bei der Selektion des Kollektivs wurde kein Fokus daraufgelegt, ob ein Plattenepithelkarzinom vorliegt. Möglicherweise sind beispielsweise Weichteilkarzinome mit einbegriffen. Dieses weitere Exklusionskriterium wäre von Vorteil gewesen. Nichtsdestotrotz sind in Anlehnung an den statistischen Mittelwert der aktuellen Literatur 90 % aller Oropharynxtumore Plattenepithelkarzinome.

Die Analyse der Tumoreigenschaften mithilfe von TMAs bringt Vorteile, aber auch Nachteile mit sich. Einerseits ist die gleichzeitige Färbung vieler verschiedener Tumore möglich, wodurch Färbungsunterschiede, die auf das Färbungsverfahren zurückzuführen sind, minimiert werden können. Andererseits sind TMA-Cores nicht repräsentativ für den kompletten Tumor. Um der Repräsentativität etwas näher zu kommen, wurde jeweils der Mittelwert von zwei Cores des gleichen Schnittes gebildet.

Die größte Limitation bei der Auswertung der Arbeit ist aus meiner Sicht das Fehlen von gesundem Gewebe, wodurch der Vergleich zum gesunden Gewebe nicht möglich war. Die Entnahme von Gewebeproben dient meist dem Ausschluss beziehungsweise der Bestätigung der Verdachtsdiagnose und ist aus diesem Grund nicht „gesund“. Deswegen ist es strittig, welches Gewebe als gesundes Gewebe verwendet werden kann. Manche Autoren verwendeten das bakteriell oder durch ein Virus infiziertes Gewebe als Vergleichsgewebe. Möglicherweise hätte man das peritumorale Epithelgewebe analysieren können und es dem Tumorgewebe gegenüberstellen können.

## 6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Studie die potenzielle Bedeutung des Immuninfiltrats und des Komplementsystems für die Prognose und somit für das Patientenmanagement zeigt. Die TMA-Färbung von Oropharynxkarzinomen mit dem Komplementfaktor C5a bestätigte, dass das Überleben möglicherweise von der C5a-Färbungsintensität von Tumorzellen abhängig ist. Dabei war eine stärkere Färbungsintensität mit einem geringeren Überleben verbunden. Teilte man das Kollektiv weiter nach dem HPV-Status ein, konnte beobachtet werden, dass die Überlebenskurven in Abhängigkeit der C5a-Färbungsintensität bei HPV-negativen Patienten weiter auseinandergehen, während die Diskrepanz bei HPV-positiven Patienten stark abnahm.

Das verringerte Überleben bei HPV-negativen Oropharynx Tumoren mit starker Färbung der Tumorzellen gegen C5a ließ sich dadurch erklären, dass eine starke C5a-Färbungsintensität mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen assoziiert war. Bei HPV-negativen Tumoren wirkte das Komplementsystem folglich möglicherweise protumoral.

Die Analyse der HPV-positiven Oropharynx Tumore gestaltete sich komplexer. Ein direkter Zusammenhang des Überlebens mit dem Komplementfaktor C5a konnte nicht festgestellt werden. Allerdings korrelierte die Färbungsintensität des C5a mit der des FH. Darüber hinaus zeigte sich eine Korrelation der Färbungsintensität des FH mit der Anzahl der im Core vorhandenen Immunzellen. Und je stärker die Tumorzellen mit FH gefärbt waren, desto eher wiesen die Oropharynx Tumore Lymphknotenmetastasen auf. Somit ließ sich der Verdacht aufstellen, dass HPV-positiv Oropharynx Tumore weniger vom C5a in Tumorzellen abhängig sind. Vielmehr werden diese Tumore möglicherweise von Immunzellen und dem Komplementinhibitor FH beeinflusst. Eventuell könnte man hier schlussfolgern, dass das Komplementsystem antitumoral wirkt.

Ob das Komplementsystem eine protumorale oder antitumorale Funktion ausübt, beantwortet Okrój folgendermaßen:

„Die Tumorzellen [scheinen] das Komplementsystem in Abhängigkeit vom TME aktiv zu regulieren [...].“ (übersetzt durch den Autor) [51].

Er unterscheidet zwischen soliden und liquiden Tumoren. „Maßgeblich für das Wachstum solider Tumore ist die Angiogenese, Migration und die Degradation der Extrazellulärmatrix. [Im Kontrast dazu], haben liquide Tumore ihren Ursprung im Knochenmark, in peripheren Blutge-

## Zusammenfassung

fäßen oder Lymphknoten, bei denen reichhaltig Komplementfaktoren und Nährstoffe vorhanden sind“ (übersetzt durch den Autor) [51], so dass andere Faktoren zur Tumorprogression benötigt werden.

HPV-negative Tumore, die bei unserem Kollektiv mehr mit dem Tabakkonsum assoziiert waren, könnte man als soliden Tumor kategorisieren. Möglicherweise zeigen HPV-positive Tumore mehr den Charakter von liquiden Tumoren. Somit bestimmt möglicherweise die Ursache, die zur Tumorentstehung bei Oropharynxkarzinomen beigetragen hat, die Eigenschaften der Tumormikroumgebung und den Charakter des Tumors.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Jamal, Z. and F. Anjum, *Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
2. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. *CA Cancer J Clin*, 2021. **71**(3): p. 209-249.
3. Wagner, S., et al., [*HPV-associated oropharyngeal cancer-incidence, trends, diagnosis, and treatment*]. *Urologe A*, 2018. **57**(12): p. 1457-1463.
4. Vigneswaran, N. and M.D. Williams, *Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis*. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 2014. **26**(2): p. 123-41.
5. Wagner, S., et al., [*The innate immune system in oropharyngeal squamous cell carcinoma : Immune modulation by HPV*]. *HNO*, 2018. **66**(4): p. 301-307.
6. Budu, V.A., et al., *The role of HPV infection in oropharyngeal cancer*. *Rom J Morphol Embryol*, 2019. **60**(3): p. 769-773.
7. Bareke, H. and J. Akbuga, *Complement system's role in cancer and its therapeutic potential in ovarian cancer*. *Scand J Immunol*, 2018. **88**(1): p. e12672.
8. Jiang, S. and Y. Dong, *Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future*. *Curr Probl Cancer*, 2017. **41**(5): p. 323-327.
9. Spence, T., et al., *HPV Associated Head and Neck Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2016. **8**(8).
10. Dayyani, F., et al., *Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC)*. *Head Neck Oncol*, 2010. **2**: p. 15.
11. You, E.L., M. Henry, and A.G. Zeitouni, *Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: review of current evidence and management*. *Curr Oncol*, 2019. **26**(2): p. 119-123.
12. Aumüller A., A.G., Doll A., Engele J., Kirsch J., Mense S., Reißig D., Salvetter K., Schmidt W., Schmitz F., Schulte E., Spanel-Borowski K., Wolff W., Wurzinger L., Zilch H., *Duale Reihe Anatomie*, ed. Auflage. 2010, Stuttgart: Thieme Verlag.
13. Dok, R., et al., *Dual role for p16 in the metastasis process of HPV positive head and neck cancers*. *Mol Cancer*, 2017. **16**(1): p. 113.
14. Ward, M.J., et al., *Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(2): p. 489-500.
15. Chernock, R.D., *Morphologic features of conventional squamous cell carcinoma of the oropharynx: 'keratinizing' and 'nonkeratinizing' histologic types as the basis for a consistent classification system*. *Head Neck Pathol*, 2012. **6 Suppl 1**(Suppl 1): p. S41-7.
16. Becker, C., et al., [*The 8th edition of the TNM staging system-a curse or a blessing for oropharyngeal carcinoma?*]. *HNO*, 2021. **69**(2): p. 89-94.
17. Wittekindt, C., et al., *HPV - A different view on Head and Neck Cancer*. *Laryngorhinootologie*, 2018. **97**(S 01): p. S48-S113.
18. Amini, A. and S.D. Karam, *Concurrent chemotherapy in oropharyngeal cancer: Cisplatin wins*. *Oncotarget*, 2019. **10**(6): p. 624-625.
19. Almangush, A., et al., *Tumour-infiltrating lymphocytes in oropharyngeal cancer: a validation study according to the criteria of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group*. *Br J Cancer*, 2022. **126**(11): p. 1589-1594.
20. Hamilton, D., et al., *The changing landscape of oropharyngeal cancer management*. *J Laryngol Otol*, 2017. **131**(1): p. 3-7.
21. Oosthuizen, J.C. and J.B. Kinsella, *Is treatment de-escalation a reality in HPV related oropharyngeal cancer?* *Surgeon*, 2016. **14**(4): p. 180-3.
22. Berman, T.A. and J.T. Schiller, *Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases*. *Cancer*, 2017. **123**(12): p. 2219-2229.
23. Kansy, B. and S. Lang, *Immunotherapy - The New Era of Oncology*. *Laryngorhinootologie*, 2018. **97**(S 01): p. S3-S47.
24. Taberna, M., et al., *Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer*. *Ann Oncol*, 2017. **28**(10): p. 2386-2398.

25. Gameiro, S.F., A.M. Evans, and J.S. Mymryk, *The tumor immune microenvironments of HPV(+) and HPV(-) head and neck cancers*. WIREs Mech Dis, 2022. **14**(2): p. e1539.
26. Ferris, R.L. and W. Westra, *Oropharyngeal Carcinoma with a Special Focus on HPV-Related Squamous Cell Carcinoma*. Annu Rev Pathol, 2023. **18**: p. 515-535.
27. Westrich, J.A., C.J. Warren, and D. Pyeon, *Evasion of host immune defenses by human papillomavirus*. Virus Res, 2017. **231**: p. 21-33.
28. Shamseddine, A.A., et al., *Tumor Immunity and Immunotherapy for HPV-Related Cancers*. Cancer Discov, 2021. **11**(8): p. 1896-1912.
29. Serra, S. and R. Chetty, *p16*. J Clin Pathol, 2018. **71**(10): p. 853-858.
30. Li, M., et al., *p16 promotes proliferation in cervical carcinoma cells through CDK6-HuR-IL1A axis*. J Cancer, 2020. **11**(6): p. 1457-1467.
31. Pereira, E.R., et al., *The lymph node microenvironment and its role in the progression of metastatic cancer*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **38**: p. 98-105.
32. Datta, K., et al., *Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer*. Future Oncol, 2010. **6**(5): p. 823-36.
33. Welsch, *Lehrbuch Histologie*, ed. Auflage. 2010, München: Elsevier GmbH.
34. Zhou, H., P.J. Lei, and T.P. Padera, *Progression of Metastasis through Lymphatic System*. Cells, 2021. **10**(3).
35. Kochanek, D.M., et al., *Complementing Cancer Metastasis*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1629.
36. du Bois, H., T.A. Heim, and A.W. Lund, *Tumor-draining lymph nodes: At the crossroads of metastasis and immunity*. Sci Immunol, 2021. **6**(63): p. eabg3551.
37. Rink L., K.A., Haase H., *Immunologie für Einsteiger*, ed. Auflage. 2015, Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
38. Heinrich P., M.M., Graeve L., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, ed. Auflage. 2014, Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
39. Zhang, R., et al., *Role of the complement system in the tumor microenvironment*. Cancer Cell Int, 2019. **19**: p. 300.
40. Kolev, M. and M.M. Markiewski, *Targeting complement-mediated immunoregulation for cancer immunotherapy*. Semin Immunol, 2018. **37**: p. 85-97.
41. Kleczko, E.K., et al., *Targeting the Complement Pathway as a Therapeutic Strategy in Lung Cancer*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 954.
42. Mamidi, S., S. Hone, and M. Kirschfink, *The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion*. Immunobiology, 2017. **222**(1): p. 45-54.
43. Cserhalmi, M., et al., *Regulation of regulators: Role of the complement factor H-related proteins*. Semin Immunol, 2019. **45**: p. 101341.
44. Roumenina, L.T., et al., *Context-dependent roles of complement in cancer*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(12): p. 698-715.
45. Pio, R., L. Corrales, and J.D. Lambris, *The role of complement in tumor growth*. Adv Exp Med Biol, 2014. **772**: p. 229-62.
46. Kirschfink, M., *Targeting complement in therapy*. Immunol Rev, 2001. **180**: p. 177-89.
47. Murphy K., W.C., *Janeway Immunologie*, ed. Auflage. 2018: Springer Spektrum Verlag.
48. Chen, J.Y., C. Cortes, and V.P. Ferreira, *Properdin: A multifaceted molecule involved in inflammation and diseases*. Mol Immunol, 2018. **102**: p. 58-72.
49. Parente, R., et al., *Complement factor H in host defense and immune evasion*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(9): p. 1605-1624.
50. Reis, E.S., et al., *Complement in cancer: untangling an intricate relationship*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(1): p. 5-18.
51. Okroj, M. and J. Potempa, *Complement Activation as a Helping Hand for Inflammophilic Pathogens and Cancer*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 3125.
52. Geller, A. and J. Yan, *The Role of Membrane Bound Complement Regulatory Proteins in Tumor Development and Cancer Immunotherapy*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1074.
53. Liu, X.Y., et al., *Recent progress in the understanding of complement activation and its role in tumor growth and anti-tumor therapy*. Biomed Pharmacother, 2017. **91**: p. 446-456.
54. Rutkowski, M.J., et al., *Cancer and the complement cascade*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(11): p. 1453-65.
55. Darling, V.R., et al., *Immunological effects and therapeutic role of C5a in cancer*. Expert Rev Clin Immunol, 2015. **11**(2): p. 255-63.

56. Gunn, L., et al., *Opposing roles for complement component C5a in tumor progression and the tumor microenvironment*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2985-94.
57. Ajona, D., et al., *Complement in Metastasis: A Comp in the Camp*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 669.
58. Imamura, T., et al., *Influence of the C5a-C5a receptor system on breast cancer progression and patient prognosis*. Breast Cancer, 2016. **23**(6): p. 876-885.
59. Khan, M.A., A.M. Assiri, and D.C. Broering, *Complement and macrophage crosstalk during process of angiogenesis in tumor progression*. J Biomed Sci, 2015. **22**: p. 58.
60. Buhe, V., et al., *Updating the physiology, exploration and disease relevance of complement factor H*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2010. **23**(2): p. 397-404.
61. Horl, S., et al., *Complement factor H-derived short consensus repeat 18-20 enhanced complement-dependent cytotoxicity of ofatumumab on chronic lymphocytic leukemia cells*. Haematologica, 2013. **98**(12): p. 1939-47.
62. Campa, M.J., et al., *Complement Factor H Antibodies from Lung Cancer Patients Induce Complement-Dependent Lysis of Tumor Cells, Suggesting a Novel Immunotherapeutic Strategy*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(12): p. 1325-32.
63. Junnikkala, S., et al., *Secretion of soluble complement inhibitors factor H and factor H-like protein (FHL-1) by ovarian tumour cells*. Br J Cancer, 2002. **87**(10): p. 1119-27.
64. Junnikkala, S., et al., *Exceptional resistance of human H2 glioblastoma cells to complement-mediated killing by expression and utilization of factor H and factor H-like protein 1*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 6075-81.
65. Rodriguez de Cordoba, S., et al., *The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations*. Mol Immunol, 2004. **41**(4): p. 355-67.
66. Riihila, P.M., et al., *Complement factor H: a biomarker for progression of cutaneous squamous cell carcinoma*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(2): p. 498-506.
67. Timar, K.K., et al., *Human keratinocytes produce the complement inhibitor factor I: Synthesis is regulated by interferon-gamma*. Mol Immunol, 2007. **44**(11): p. 2943-9.
68. Laskowski, J., et al., *Complement factor H-deficient mice develop spontaneous hepatic tumors*. J Clin Invest, 2020. **130**(8): p. 4039-4054.
69. Wilczek, E., et al., *The possible role of factor H in colon cancer resistance to complement attack*. Int J Cancer, 2008. **122**(9): p. 2030-7.
70. Ajona, D., et al., *Down-regulation of human complement factor H sensitizes non-small cell lung cancer cells to complement attack and reduces in vivo tumor growth*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5991-8.
71. Cheng, Z.Z., et al., *Complement factor H as a marker for detection of bladder cancer*. Clin Chem, 2005. **51**(5): p. 856-63.
72. Blom, A.M., *The role of complement inhibitors beyond controlling inflammation*. J Intern Med, 2017. **282**(2): p. 116-128.
73. Li, B., et al., *CD59 is overexpressed in human lung cancer and regulates apoptosis of human lung cancer cells*. Int J Oncol, 2013. **43**(3): p. 850-8.
74. Fishelson, Z., et al., *Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors*. Mol Immunol, 2003. **40**(2-4): p. 109-23.
75. Li, B., et al., *The effects of CD59 gene as a target gene on breast cancer cells*. Cell Immunol, 2011. **272**(1): p. 61-70.
76. Zhang, R., et al., *Pancreatic cancer-educated macrophages protect cancer cells from complement-dependent cytotoxicity by up-regulation of CD59*. Cell Death Dis, 2019. **10**(11): p. 836.
77. You, T., et al., *Application of a novel inhibitor of human CD59 for the enhancement of complement-dependent cytolysis on cancer cells*. Cell Mol Immunol, 2011. **8**(2): p. 157-63.
78. Shimo, K., et al., *Complement regulatory proteins in normal human esophagus and esophageal squamous cell carcinoma*. J Gastroenterol Hepatol, 2004. **19**(6): p. 643-7.
79. Zhou, Y., et al., *CD59 is a potential biomarker of esophageal squamous cell carcinoma radioresistance by affecting DNA repair*. Cell Death Dis, 2018. **9**(9): p. 887.
80. Shang, Y., et al., *Systematic immunohistochemical analysis of the expression of CD46, CD55, and CD59 in colon cancer*. Arch Pathol Lab Med, 2014. **138**(7): p. 910-9.

81. Ravindranath, N.M. and C. Shuler, *Expression of complement restriction factors (CD46, CD55 & CD59) in head and neck squamous cell carcinomas*. J Oral Pathol Med, 2006. **35**(9): p. 560-7.
82. Saber, C.N., et al., *Immune cells and prognosis in HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinomas: Review of the literature*. Oral Oncol, 2016. **58**: p. 8-13.
83. Pretscher, D., et al., *Distribution of immune cells in head and neck cancer: CD8+ T-cells and CD20+ B-cells in metastatic lymph nodes are associated with favourable outcome in patients with oro- and hypopharyngeal carcinoma*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 292.
84. Wu, T. and Y. Dai, *Tumor microenvironment and therapeutic response*. Cancer Lett, 2017. **387**: p. 61-68.
85. Mantovani, A., et al., *Innate immunity, inflammation and tumour progression: double-edged swords*. J Intern Med, 2019. **285**(5): p. 524-532.
86. Quismorio Jr., F.P., Quismorio, Anne V. , *Clinical Application of Serologic Tests, Serum Protein Abnormalities, and Other Clinical Laboratory Tests in Systemic Lupus Erythematosus*. Elsevier, 2019: p. 579-597.
87. Bonavita, E., et al., *PTX3 is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer*. Cell, 2015. **160**(4): p. 700-714.
88. Zha, H., et al., *Blocking C5aR signaling promotes the anti-tumor efficacy of PD-1/PD-L1 blockade*. Oncoimmunology, 2017. **6**(10): p. e1349587.
89. Ping, Q., et al., *Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions*. Cancer Gene Ther, 2021. **28**(9): p. 984-999.
90. Xing, F., J. Saidou, and K. Watabe, *Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment*. Front Biosci (Landmark Ed), 2010. **15**(1): p. 166-79.
91. Hida, K., et al., *The Roles of Tumor Endothelial Cells in Cancer Metastasis*, in *Metastasis*, C.M. Sergi, Editor. 2022: Brisbane (AU).
92. Lechner, M., et al., *HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management*. Nat Rev Clin Oncol, 2022. **19**(5): p. 306-327.
93. Dong, Z., et al., *Immunodiagnosis and Immunotherapeutics Based on Human Papillomavirus for HPV-Induced Cancers*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 586796.
94. Berraondo, P., et al., *Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance*. Immunol Rev, 2016. **274**(1): p. 290-306.
95. Fasano, M., et al., *Immunotherapy for head and neck cancer: Present and future*. Crit Rev Oncol Hematol, 2022. **174**: p. 103679.
96. Yang, C., et al., *Overexpression of complement C5a indicates poor survival and therapeutic response in metastatic renal cell carcinoma*. Int J Biol Markers, 2023: p. 3936155231161366.
97. Ajona, D., et al., *A Combined PD-1/C5a Blockade Synergistically Protects against Lung Cancer Growth and Metastasis*. Cancer Discov, 2017. **7**(7): p. 694-703.
98. Bischoff, A., *Cetuximab: Ein Antikörper gegen mehrere Tumorentitäten*. Dtsch Arztebl International, 2004. **101**(36): p. A-2406.
99. Cheng, G., et al., *A review on the advances and challenges of immunotherapy for head and neck cancer*. Cancer Cell Int, 2021. **21**(1): p. 406.
100. Michels, A., J. Hartmann, and C.J. Buchholz, *[Chimeric antigen receptors in oncology: clinical applications and new developments]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2020. **63**(11): p. 1331-1340.
101. Lee, M.Y. and C.T. Allen, *Immunotherapy for HPV Malignancies*. Semin Radiat Oncol, 2021. **31**(4): p. 361-370.
102. Bankhead, P., et al., *QuPath: Open source software for digital pathology image analysis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 16878.
103. Ram, S., et al., *Pixelwise H-score: A novel digital image analysis-based metric to quantify membrane biomarker expression from immunohistochemistry images*. PLoS One, 2021. **16**(9): p. e0245638.
104. Kapka-Skrzypczak, L., et al., *The immunohistochemical analysis of membrane-bound CD55, CD59 and fluid-phase FH and FH-like complement inhibitors in cancers of ovary and corpus uteri origin*. Cent Eur J Immunol, 2015. **40**(3): p. 349-53.
105. Johnson, E.M., et al., *Complement Factor H in cSCC: Evidence of a Link Between Sun Exposure and Immunosuppression in Skin Cancer Progression*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 819580.

106. Dagan, M.V., et al., *Intracellular Factor H Drives Tumor Progression Independently of the Complement Cascade*. *Cancer Immunol Res*, 2021. **9**(8): p. 909-925.
107. Xi, W., et al., *High Level of Anaphylatoxin C5a Predicts Poor Clinical Outcome in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 29177.
108. Ding, P., et al., *Intracellular complement C5a/C5aR1 stabilizes beta-catenin to promote colorectal tumorigenesis*. *Cell Rep*, 2022. **39**(9): p. 110851.
109. Yoneda, M., et al., *Enhancement of cancer invasion and growth via the C5a-C5a receptor system: Implications for cancer promotion by autoimmune diseases and association with cervical cancer invasion*. *Oncol Lett*, 2019. **17**(1): p. 913-920.
110. Wirsing, A.M., et al., *Validation of Selected Head and Neck Cancer Prognostic Markers from the Pathology Atlas in an Oral Tongue Cancer Cohort*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(10).
111. Amini, A., et al., *Predictors of overall survival in human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer using the National Cancer Data Base*. *Oral Oncol*, 2016. **56**: p. 1-7.
112. Jacobi, C., et al., *Prognostic value of the lymph node ratio in oropharyngeal carcinoma stratified for HPV-status*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2018. **275**(2): p. 515-524.
113. Mito, I., et al., *Comprehensive analysis of immune cell enrichment in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 16134.
114. Bhatt, K.H., et al., *Correction: Profiling HPV-16-specific T cell responses reveals broad antigen reactivities in oropharyngeal cancer patients*. *J Exp Med*, 2022. **219**(11).
115. Sayegh, E.T., O. Bloch, and A.T. Parsa, *Complement anaphylatoxins as immune regulators in cancer*. *Cancer Med*, 2014. **3**(4): p. 747-58.
116. Canales, N.A., et al., *AIBG and C3 are overexpressed in patients with cervical intraepithelial neoplasia III*. *Oncol Lett*, 2014. **8**(2): p. 939-947.
117. Capone, E., S. Iacobelli, and G. Sala, *Role of galectin 3 binding protein in cancer progression: a potential novel therapeutic target*. *J Transl Med*, 2021. **19**(1): p. 405.
118. Song, S.H., et al., *Interferon-gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV)*. *Gynecol Oncol*, 2008. **108**(3): p. 543-8.
119. Lin, C.M., et al., *The expression and prognostic impact of proinflammatory cytokines and their associations with carcinogens in oropharyngeal squamous cell carcinoma*. *Cancer Immunol Immunother*, 2020. **69**(4): p. 549-558.
120. Smolag, K.I., et al., *Complement inhibitor factor H expressed by breast cancer cells differentiates CD14(+) human monocytes into immunosuppressive macrophages*. *Oncoimmunology*, 2020. **9**(1): p. 1731135.
121. Wilde, D.C., et al., *Oropharyngeal cancer outcomes correlate with p16 status, multinucleation and immune infiltration*. *Mod Pathol*, 2022. **35**(8): p. 1045-1054.
122. Mandal, R., et al., *The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications*. *JCI Insight*, 2016. **1**(17): p. e89829.
123. Pio, R., et al., *Complement factor H is elevated in bronchoalveolar lavage fluid and sputum from patients with lung cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010. **19**(10): p. 2665-72.
124. Cai, K., et al., *C5a promotes the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells through PCAF-mediated STAT3 acetylation*. *Oncol Rep*, 2014. **32**(5): p. 2260-6.
125. Zou, S., et al., *Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy*. *Mol Cancer*, 2020. **19**(1): p. 145.
126. Jochems, C. and J. Schlom, *Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011. **236**(5): p. 567-79.
127. Piersma, S.J., et al., *High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(1): p. 354-61.
128. Bussu, F., et al., *IFN-gamma and other serum cytokines in head and neck squamous cell carcinomas*. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2018. **38**(2): p. 94-102.
129. Chu, H.W., et al., *Identification of Salivary Biomarkers for Oral Cancer Detection with Untargeted and Targeted Quantitative Proteomics Approaches*. *Mol Cell Proteomics*, 2019. **18**(9): p. 1796-1806.
130. Bushey, R.T., et al., *Complement factor H protects tumor cell-derived exosomes from complement-dependent lysis and phagocytosis*. *PLoS One*, 2021. **16**(6): p. e0252577.
131. Afshar-Kharghan, V., *The role of the complement system in cancer*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(3): p. 780-789.

## Literaturverzeichnis

132. Markiewski, M.M. and J.D. Lambris, *Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma*. Trends Immunol, 2009. **30**(6): p. 286-92.
133. Gadwa, J., et al., *Complement C3a and C5a receptor blockade modulates regulatory T cell conversion in head and neck cancer*. J Immunother Cancer, 2021. **9**(3).
134. Cai, B., et al., *Rapid degradation of the complement regulator, CD59, by a novel inhibitor*. J Biol Chem, 2014. **289**(17): p. 12109-12125.
135. Kim, D.Y., et al., *Expression of complement protein C5a in a murine mammary cancer model: tumor regression by interference with the cell cycle*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(10): p. 1026-37.

## 8 Lebenslauf des Autors

Teri Kim,

\*7. Februar 1995 in Seoul (Korea)

### Tätigkeit als Zahnärztin

Seit 2023	angestellte Zahnärztin in Nackenheim
2021-2022	Assistenz Zahnärztin in Wiesbaden
2020	Assistenz Zahnärztin in Frankfurt
Januar 2020	Erteilung der zahnärztlichen Approbation durch Landesamt Rheinland-Pfalz

### Schul- und Berufsausbildung

2014-2019	Studium und Staatsexamen der Zahnmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Abschlussnote: sehr gut
Seit 2018	Promotionsstudium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
2005-2014	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife an der Maria Ward-Schule Mainz, Abschlussnote: 1,4
1999-2013	Koreanische Schule in Frankfurt am Main e.V.