

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

*Erstellung und Charakterisierung eines Tumorkollektivs epithelialer Kopf-Hals-Tumoren
durch Analyse der Prävalenz PD-L1-positiver Tumoren und Untersuchung der
dazugehörigen Immunresponse PD-1-positiver Lymphozyten*

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Juliane Constance Klöckl
aus Schwerin

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 07.12.2021

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Abstrakt	- 1 -
2. Einführung.....	- 2 -
2.1. Grundlagen der Tumorpathologie	- 2 -
2.1.1. Tumorwachstum.....	- 2 -
2.1.2. Kennzeichen maligner Tumoren	- 2 -
2.1.3. Invasion und Metastasierung	- 2 -
2.1.4. Auswirkungen, Symptome und Konsequenzen von Tumorbildung	- 3 -
2.2. Plattenepithelkarzinome.....	- 4 -
2.2.1. Makroskopische und mikroskopische Kennzeichen	- 4 -
2.2.2. Epidemiologie für PECA des Kopf-Hals-Bereiches	- 4 -
2.2.3. Ätiologie, Risikofaktoren und Pathomechanismus zur Entstehung von PECA.....	- 5 -
2.3. Bedeutung der pathologischen Diagnostik bezüglich der Tumorklassifikation.....	- 7 -
2.3.1. Tumorklassifikation	- 7 -
2.3.2. Tumor-Grading.....	- 8 -
2.3.3. Diagnosesicherung bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs	- 8 -
2.4. Tumورimmunologie	- 9 -
2.4.1. Abwehrmechanismen gegen transformierte Zellen	- 9 -
2.4.2. PD-1 und seine Liganden - Aufbau und Funktion.....	- 12 -
2.4.2.1. Struktureller Aufbau von PD-1	- 13 -
2.4.2.2. Struktureller Aufbau und Vorkommen von PD-L1	- 15 -
2.4.2.3. <i>Cluster of differentiation</i> : Unterstützer im Rahmen von Immunantworten	- 16 -
2.4.3. Strategien der Tumorevasion und Besonderheiten HPV-positiver PECA	- 18 -
2.4.3.1. Tumorevasion über den PD-1:PD-L1-Signalweg	- 20 -
2.4.3.2. Besonderheiten HPV-positiver PECA des Kopf-Hals Bereichs	- 20 -
2.4.4. Therapeutische Manipulation des Immunsystems.....	- 22 -
2.4.4.1. Pembrolizumab – ein Checkpoint-Inhibitor	- 23 -
2.5. Fragestellung.....	- 25 -

3.	Material und Methoden	- 26 -
3.1.	Material.....	- 26 -
3.2.	Methoden	- 30 -
3.2.1.	Patientenrecherche	- 30 -
3.2.2.	Probenauswahl	- 31 -
3.2.3.	Gewebevorbereitung.....	- 31 -
3.2.4.	Herstellung von Tissue Microarrays (TMA).....	- 31 -
3.2.4.1.	Auswahl der Spenderblöcke	- 32 -
3.2.4.2.	Herstellen des Empfängerblocks	- 32 -
3.2.5.	Erstellung von Paraffinschnitten	- 32 -
3.2.6.	Das Färben der Schnittpräparate.....	- 33 -
3.2.7.	Digitale Bildanalyse der Färbeergebnisse	- 35 -
3.2.8.	Bestimmung von <i>Cut-off</i> -Levels.....	- 37 -
3.2.9.	Statistische Auswertung.....	- 37 -
4.	Ergebnisse	- 40 -
4.1.	Gesamtkollektiv	- 40 -
4.2.	Qualitative Analyse der Färbeergebnisse	- 41 -
4.3.	Assoziationen mit PD-L1.....	- 42 -
4.3.1.	Assoziation von PD-L1 und PD-1-Positivität.....	- 42 -
4.3.2.	Assoziation von PD-L1 und CD3-Positivität.....	- 44 -
4.3.3.	Assoziation von PD-L1 und CD4-Positivität.....	- 46 -
4.3.4.	Assoziation von PD-L1 und CD8-Positivität.....	- 47 -
4.3.5.	Assoziation von PD-L1 und CD56-Positivität.....	- 49 -
4.3.6.	Assoziation von PD-L1 und CD68-Positivität.....	- 50 -
4.4.	Assoziation von PD-L1 und klinischen Parametern.....	- 52 -
4.4.1.	Assoziation von PD-L1 und Alter	- 52 -
4.4.2.	Assoziation von PD-L1 und Geschlecht.....	- 53 -
4.4.3.	Assoziation von PD-L1 und Alkoholkonsum	- 53 -
4.4.4.	Assoziation von PD-L1 und Tabakkonsum	- 54 -
4.4.5.	Assoziation von PD-L1 und Tumorlokalisierung	- 55 -
4.4.6.	Assoziation von PD-L1 und Tumorart	- 57 -
4.4.7.	Assoziation von PD-L1 und TNM-Stadium	- 58 -
4.4.8.	Assoziation von PD-L1 und Grading	- 62 -
4.4.9.	Assoziation von PD-L1 und Therapieform	- 63 -
4.4.10.	Assoziation von PD-L1 und R-Status	- 65 -
4.4.11.	Assoziation von PD-L1 und Tumorfreiheit.....	- 66 -
4.4.12.	Assoziation von PD-L1 und Gesamtüberleben.....	- 68 -
4.4.13.	Assoziation von PD-L1 und rezidivfreier Zeit.....	- 69 -

5.	Diskussion.....	- 71 -
6.	Literaturverzeichnis.....	- 87 -
	Appendix	i
	Lebenslauf.....	ix
	Eidesstattliche Versicherung	x
	Danksagung	xi

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wiederherstellung der T-Zellaktivierung durch CTLA-4-Blockade.	- 12 -
Abbildung 2: PD-1-Bindung dämpft das TZR-Signal, kann jedoch durch CD28-Costimulation überwunden werden.	- 14 -
Abbildung 3: Die wachsende Zahl von B7-Molekülen beeinflusst das TZR-Signal.	- 15 -
Abbildung 4: Classifier und Real-time-tuning.	- 36 -
Abbildung 5: Beispielhafte immunhistochemische Färbungen zur Visualisierung der Zielantigene.	- 41 -
Abbildung 6: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und PD-1-Positivität der Gewebeproben.	- 43 -
Abbildung 7: Assoziation der Mittelwertunterschiede von PD-1-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus....	- 44 -
Abbildung 8: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und CD3-Positivität der Gewebeproben.	- 45 -
Abbildung 9: Assoziation der Mittelwertunterschiede von CD3-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus....	- 45 -
Abbildung 10: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und CD4-Positivität der Gewebeproben.	- 46 -
Abbildung 11: Assoziation der Mittelwertunterschiede von CD4-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus...	- 47 -
Abbildung 12: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und CD8-Positivität der Gewebeproben.	- 48 -
Abbildung 13: Assoziation der Mittelwertunterschiede von CD8-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus...	- 48 -
Abbildung 14: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und CD56-Positivität der Gewebeproben.	- 49 -
Abbildung 15: Assoziation der Mittelwertunterschiede von CD56-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus.	- 50 -
Abbildung 16: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und CD68-Positivität der Gewebeproben.	- 51 -
Abbildung 17: Assoziation der Mittelwertunterschiede von CD68-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus.	- 51 -
Abbildung 18: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Alter zum Diagnosezeitpunkt.	- 52 -
Abbildung 19: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Geschlecht.	- 53 -
Abbildung 20: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Alkoholkonsum.	- 54 -
Abbildung 21: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Tabakkonsum.	- 55 -
Abbildung 22: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Tumorlokalisation.	- 56 -
Abbildung 23: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Tumorart.	- 58 -
Abbildung 24: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Tumorstatus.	- 59 -
Abbildung 25: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Lymphknotenbefall.	- 60 -
Abbildung 26: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Fernmetastasierung.	- 61 -
Abbildung 27: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Grading.	- 63 -
Abbildung 28: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Therapieform.	- 65 -
Abbildung 29: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und R-Status.	- 66 -
Abbildung 30: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Tumorfreiheit.	- 67 -
Abbildung 31: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Gesamtüberleben.	- 69 -
Abbildung 32: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs.	- 70 -
Abbildung 33: Rastergesamtübersicht der TMA-Positionierung.	vi

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Arbeitsgeräte	- 26 -
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien.....	- 27 -
Tabelle 3: Lösungen	- 28 -
Tabelle 4: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	- 28 -
Tabelle 5: Software.....	- 29 -
Tabelle 6: Antikörper	- 33 -
Tabelle 7: Fallzahlen pro Analyse	- 40 -

Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
Bcl-xL	<i>engl.</i> B-cell lymphoma-extra large
BTLA	<i>engl.</i> B- and T-lymphocyte attenuator
bzgl.	bezüglich
CD	<i>engl.</i> Cluster of Differentiation
CPS	<i>engl.</i> Combined Positive Score
CT	Computertomographie
CTLA-4	<i>engl.</i> Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DAB	3'-Diaminobenzidine
DNA	<i>engl.</i> Desoxyribonucleid acid
<i>engl.</i>	englisch
evtl.	eventuell
<i>frz.</i>	französisch
FWER	familywise error rate
GATA-3	<i>engl.</i> GATA binding protein 3
ggf.	gegebenenfalls
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin/ Eosin
HPV	Humanes Papillomavirus
ICD-10	<i>engl.</i> International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
ICOS	<i>engl.</i> Inducible T-cell co-stimulator
i.e.	<i>lat.</i> id est
IgC	konstante Immunglobulin-Domäne
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgV	variable Immunglobulin-Domäne
IHC	Immunhistochemie
IL-2	Interleukin-2
IL-10	Interleukin-10
IFN-gamma	Interferon-gamma
i.S.	im Sinne
ITSM	<i>engl.</i> Immunoreceptor tyrosine switch motif
<i>lat.</i>	lateinisch

M	Metastasierung
MHC	<i>engl.</i> Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Lymphknotenbefall (<i>lat.</i> nodus)
NCAM	<i>engl.</i> Neural cell adhesion molecules
NK	Natürliche Killerzelle
NSCLC	<i>engl.</i> non-small cell lung cancer
o.g.	oben genannte(r)
PECA	Plattenepithelkarzinom
PD-1	<i>engl.</i> Programmed cell death protein 1
PD-L1	<i>engl.</i> Programmed cell death 1 ligand 1
PD-L2	<i>engl.</i> Programmed cell death 1 ligand 2
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
R-Status	Resektionsstatus
SHP	<i>engl.</i> Src homology region 2 domain-containing phosphatase
SDC	Syndecan
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
syn.	synonymisch
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TMA	Tissue Microarray
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TPS	<i>engl.</i> Tumor Proportion Score
T	Tumorausdehnung
TuBa	Tumordatenbank
TZR	T-Zell-Rezeptor
u.a.	unter anderem
UICC	<i>frz.</i> Union Internationale Contre le cancer
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VEGF	<i>engl.</i> Vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
(+)	positiv

1. Abstrakt

Der Rezeptor PD-1 und sein Ligand PD-L1 ermöglichen verschiedenen Tumoren das Entkommen vor einem immunologischen Angriff durch Inhibition der T-Zellaktivierung i.S. einer antitumoralen Aktivität. Die Zusammensetzung des tumorbegleitenden Entzündungsinfiltrats beeinflusst darüber hinaus die Prognose und Überlebenszeit verschiedener Tumorentitäten. Die Prävalenz PD-L1-positiver Tumoren - als Voraussetzung für einen Therapieerfolg mit Checkpointinhibitoren - wurde für verschiedene Neoplasien untersucht. Die Literatur ist im Hinblick auf Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches und insbesondere auch in Bezug auf das inflammatorische Mikromilieu des Tumors bislang jedoch eher dürftig.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Prävalenz von PD-L1 bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region sowie dessen Auswirkungen auf klinisch-pathologische Parameter untersucht. Es zeigte sich, dass die Mehrheit der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches PD-L1 exprimiert. Ferner konnte eine signifikante Verkürzung sowohl der rezidivfreien als auch Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit vom PD-L1-Expressionsstatus nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich in dieser Arbeit, dass eine zunehmende PD-L1-Expression auf Tumoren assoziiert ist mit einem steigenden prozentualen Anteil an CD3-, CD8- und CD68-positiven Zellen.

Da es sich bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches um Tumoren mit insgesamt schlechter Prognose und begrenzten Therapieoptionen handelt, könnte der breitere Einsatz von Checkpointinhibitoren vor dem Hintergrund einer mehrheitlichen PD-L1-Expression bei Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals eine neue Ära bezüglich des Gesamt- und rezidivfreien Überlebens bedeuten. Weitere Studien sind jedoch erforderlich, um den prognostischen Wert sowie weitere mögliche Einflussfaktoren auf den PD-1:PD-L1-Signalweg zu verifizieren und ableitbare Nebenwirkungen einer solchen Therapie abschätzen zu können.

2. Einführung

2.1. Grundlagen der Tumorpathologie

2.1.1. Tumorwachstum

Der Begriff Tumor (syn. Geschwulst, Neoplasma, Neubildung) meint im engeren Sinn ein überschießendes Wachstum körpereigener, transformierter Zellen, die sich der Kontrolle externer Wachstumsstimuli entzogen haben und sich somit autonom vermehren. Ursächlich dafür sind Genläsionen, die zu einer Dysbalance zwischen Zellzuwachs und Zellverlust führen. Ein Tumor besteht aus Tumorzellen (i.e. Tumorparenchym) und dem gefäßreichen Tumorstroma, das der Ernährung und somit auch den Stoffwechselprozessen und der Proliferation der Tumorzellen dient.

2.1.2. Kennzeichen maligner Tumoren

Maligne Tumoren sind in der Regel gekennzeichnet durch eine schnelle, infiltrative Proliferation, verbunden mit einem hohen Mitoseindex und Metastasierungspotential. Klinisch werden Patienten mit solchen Neoplasien relativ schnell symptomatisch und die Tendenz zur Entwicklung eines Rezidivs ist deutlich ausgeprägter als bei benignen Tumoren.

2.1.3. Invasion und Metastasierung

Die Tumordinvasion ist die Fähigkeit des Tumorparenchyms Zell- bzw. Gewebegrenzen zu überschreiten und somit infiltrativ - d.h. in das gesunde Gewebe hinein - zu wachsen.

Metastasierung beschreibt die Bildung von Absiedelungen des Primärtumors (i.e. Metastasen/ Tochtergeschwülste/ Filiae) in andere Lokalisationen eines Organismus. Der Einbruch des Tumors in das Lymph- und Blutgefäßsystem erleichtert diesen Prozess dabei erheblich.

Begründbar sind Invasion und Metastasierung durch die Auflösung von Interzellularkontakten, enzymatischer Degradation und Umbau extrazellulärer Gewebematrix sowie durch die aktive Lokomotion von Tumorzellen .

Viele Tumoren zeigen hinsichtlich der Metastasierung eine Organpräferenz, wobei sie zumeist auf lymphogenem Weg streuen. Den Lymphbahnen fehlt im Gegensatz zum Blutgefäßsystem eine Basalmembran, sodass die transformierten Zellen leicht über Lymphkapillaren in das Lymphsystem eindringen und dann in einem oder mehreren Lymphknoten proliferieren können, was letztlich zur Ausbildung einer Lymphknotenmetastase führt [2, 3].

Tumoren des Kopf- und Halsbereiches metastasieren vorrangig auf lymphogenem Weg. Sehr häufig bilden sich Metastasen in den submentalen, digastrischen und jugulären Lymphknoten. Über den Ductus thoracicus haben die Tumorzellen Anschluss an das Blutgefäßsystem, wo sie in aller Regel jedoch nicht so einfach überleben, da sie durch die Immunzellen des Blutes angegriffen und eliminiert werden können.

Die hämatogene Metastasierung basiert auf der Interaktion von Tumorzellen mit dem Gefäßsystem; d.h. die Lokalisation einer Metastase steht in engem Zusammenhang mit dem Sitz des Primarius. Im Falle der selteneren hämatogenen Metastasierung epithelialer Kopf-Hals-Tumoren erfolgt diese am wahrscheinlichsten in die Lunge [4].

2.1.4. Auswirkungen, Symptome und Konsequenzen von Tumorbildung

Lokale Auswirkungen eines malignen Tumors ergeben sich zum einen durch die Expansion des Neoplasmas mit Verdrängung und Komprimierung des gesunden Gewebes, zum anderen durch Tumornekrosen.

Die Komprimierung umliegender Strukturen kann im Kopf-Hals-Bereich neben der Funktionsstörung des betroffenen Organs auch eine lokale Ödementwicklung, Organinfarzierung bis hin zu Dysphagien bedingen, die darüber hinaus mit einem hohen Leidensdruck für den Patienten - bedingt durch Schmerzen oder Komorbiditäten - verbunden sind. Durch Tumornekrosen kann es zur Entwicklung von Ulzerationen oder Fisteln kommen. Wird ein Gefäß durch die Tumornekrose arrodirt, kann es zu Blutungen kommen, die mitunter lebensgefährlich sind.

Die wichtigsten systemischen Auswirkungen solcher malignen Erkrankungen sind Tumorkachexie und Tumoranämie. Die Tumoranämie und katabole Stoffwechsellage bedingen eine systemische Leistungsinsuffizienz, die in ihrer Endkonsequenz auch eine therapeutische Hürde darstellt, da bei einem zu schlechten Allgemeinzustand des

Patienten geeignete therapeutische Maßnahmen ggf. nicht durchgeführt werden können.

2.2. Plattenepithelkarzinome

2.2.1. Makroskopische und mikroskopische Kennzeichen

Plattenepithelkarzinome (PECA) sind maligne epitheliale Tumoren, die ihren Ursprung im Plattenepithel von Haut und Schleimhäuten haben. Makroskopisch handelt es sich dabei um Tumoren, die im fortgeschrittenen Stadium exophytisch-polypös (selten endophytisch) oder als Ulkus imponieren können [4]. Mikroskopisch wird generell zwischen verhornenden und nicht-verhornenden PECA unterschieden.

Das nicht-verhornende ist im Vergleich zum verhornenden PECA weniger differenziert, d.h. die Tumorzellen sind weniger stark ausgereift und haben weniger Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe. Die zunehmende Entdifferenzierung macht eine Aneuploidie, die ein unabhängiges Malignitätskriterium darstellt, zudem wahrscheinlicher. Ferner bewirkt die Entdifferenzierung bzw. Anaplasie den Funktionsverlust eines Gewebes. Sowohl das verhornende als auch das nicht-verhornende PECA zeigen histologisch jedoch die Gemeinsamkeiten großer, polygonaler oder spindelförmiger Zellen, die reichlich Kernatypien und atypische Mitosefiguren aufweisen [1].

2.2.2. Epidemiologie für PECA des Kopf-Hals-Bereiches

PECA von Zunge, Mundboden und Oropharynx bedingen weltweit ca. 5-6% aller malignen Tumoren [5]. Etwa 95% aller malignen Tumoren der Mundhöhle sind PECA [6] mit meist guter bis mäßiger Differenzierung, wobei Männer etwa 2 bis 3 mal häufiger erkranken als Frauen [1]. Der Altersgipfel liegt - wie für maligne Tumoren typisch - im höheren Lebensalter; im Mittel zwischen der 6. und 7. Lebensdekade [4]. Die ätiologischen Faktoren des Tabak- und Alkoholkonsums sind für die Entstehung von PECA im Kopf-Hals-Bereich seit langem bekannt, ebenso wie die potenzierende Wirkung bei gleichzeitigem Konsum beider Substanzen [4, 7]. Bei Rauchern ist das Risiko an einem Karzinom der Mundhöhle zu erkranken 2 bis 4-fach höher gegenüber der nicht-rauchenden Bevölkerung. Bei gleichzeitigem Genuss von Alkohol und Nikotin steigt das Risiko sogar auf das 6- bis 15-fache [4].

Kausal hierfür ist, dass kanzerogene Inhaltsstoffe von Zigaretten und Alkohol großflächig mit den Epithelien des Aerodigestivtraktes in Kontakt kommen und auf diese Weise eine ausgedehnte Schädigung der Schleimhaut (sogenannte *field cancerisation*) auslösen können [4, 7]. Die Wahrscheinlichkeit für Zweittumoren ist deshalb erhöht und beträgt etwa 3-7% pro Jahr [8]. Die Metastasierung erfolgt bei PECA des Kopf-Hals-Bereiches vornehmlich auf lymphogenem Weg [2]. Die generelle Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Fernmetastasen dieser Tumoren liegt bei ca. 15 % [9]. Durch sehr fortgeschrittene bzw. hohe Tumorstadien, Komorbiditäten oder einer vorliegenden Immunsuppression ist die Bildung von Filiae auch früher wahrscheinlich. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit PECA im Bereich von Kopf und Hals liegt bei etwa 40-50% [10, 11]. PECA des Hypo- und Nasopharynx werden oft erst relativ spät diagnostiziert, wenn eine Metastasierung bereits stattgefunden hat und entsprechend weit fortgeschritten ist. Bei ca. 50% der Patienten sind bei diesen Lokalisationen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Lymphknotenmetastasen vorhanden [4, 10]; die Aussicht auf eine kurative Therapie nach bisherigen Therapieoptionen minimiert sich.

2.2.3. Ätiologie, Risikofaktoren und Pathomechanismus zur Entstehung von PECA

PECA der Mundhöhle und des Pharynx entstehen nicht selten auf der Grundlage einer Leuko- bzw. Erythroleukoplakie [4, 5]. Diese fakultativ präkanzerösen Läsionen entstehen insbesondere durch chronische Entzündungen und Reizungen der Schleimhäute o.g. Lokalisationen, was am häufigsten durch regelmäßigen Alkohol- und Tabakkonsum bedingt ist [12, 13].

Entzündungen entstehen, weil das Immunsystem entartete Zellen oder körperfremde Antigene erkennt und zu eliminieren versucht. Zu diesem Zweck setzen Immunzellen Mastzellen, Zytokine und andere Botenstoffe frei; was darüber hinaus auch der Chemotaxis dient. Die Migration von Immunzellen an den Ort des entzündlichen Geschehens zieht die Bildung von freien Radikalen nach sich und bedingt somit oxidativen Stress für das betroffene Gewebe. Die Bildung von Sauerstoffradikalen führt zu Schäden an der DNA [14, 15]. Bei akuten Entzündungen sind die geschädigten Zellen meistens in der Lage diese DNA-Schäden zu beheben. Besteht das inflammatorische Geschehen jedoch längerfristig, kann die Expression von

Onkogenen und Tumorsuppressorgenen so verändert werden, dass eine Neoplasie wahrscheinlich wird [15]. Generell lässt sich sagen, dass das Risiko zur Entwicklung eines Karzinoms umso größer ist, je länger die Inflammation besteht [14]. Phänotypische Veränderungen, wie die Leukoplakie als fakultative Präkanzerose, repräsentieren präneoplastische Mutationen mit Dysregulation von Zellzyklus-Kontrollpunkten und Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen [14].

Leukoplakien stellen abnorme Verhornungsprozesse des Schleimhautepithels dar, weshalb die Läsionen makroskopisch bzw. phänotypisch weiß bis rötlich (Erythroleukoplakie) imponieren. Werden die für die Reizung ursächlichen Noxen gemieden, kann sich eine solche Präkanzerose vollständig zurückbilden. Wird eine chronische Reizung hingegen aufrechterhalten, wird die Entwicklung eines Karzinoms wahrscheinlicher. Studien haben gezeigt, dass sich bei bis zu 20% der präkanzerösen Läsionen in Folge ein Karzinom entwickelt [5, 6].

Alkohol- und Tabakkonsum sind neben der Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) die wichtigsten ätiologischen Faktoren für die Genese eines PECA im Kopf-Hals-Bereich [5, 12, 16]. Der synergistische Effekt von Alkohol und Tabak lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass Ethanol, neben seiner selbst kanzerogenen Wirkung durch Umwandlung in Acetaldehyd [17], die Gewebeporosität erhöht, wodurch die Noxen des Tabaks tiefer in das Gewebe eindringen können [17, 18] und hier zur Transformation von Zellen durch Akkumulation genetischer Veränderungen beitragen [7, 19]. Die transformierte Zelle, die beim PECA von der Basalzellschicht ausgeht, proliferiert und ersetzt so sukzessiv die gesunden Epithelzellen [20].

Der genaue Pathomechanismus des oralen und oropharyngealen PECA ist bis heute nicht abschließend geklärt. Der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 durch kanzerogene Inhaltsstoffe des Tabakrauchs [7, 19], wie auch durch HPV - insbesondere der Typen 16 und 18 - scheint dabei aber eine wichtige Rolle zu spielen. Dem Einfluss einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 bei HPV-Infektion auf die Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7 scheint hierbei eine besondere Bedeutung zuzukommen, wobei p53 normalerweise wachstumshemmende Eigenschaften besitzt, indem es regulierend in den Zellzyklus eingreift, damit die Apoptose von Zellen oder die Reparatur von DNA eingeleitet werden kann [7, 10, 21]. Wird dieses funktionelle Charakteristikum inaktiviert, können sich die Tumorzellen ungehindert teilen – es kommt zur Tumorprogression. Beide Virustypen aktivieren

darüber hinaus zelluläre Kinasen, welche ebenfalls für die Zellteilung und somit das Größenwachstum des Tumors verantwortlich sind [12]. Schätzungsweise basieren etwa 10% aller Mundhöhlenkarzinome auf einer HPV-Infektion [22], welche nach neuesten Erkenntnissen jedoch mit einer besseren Prognose im Vergleich zu HPV-negativen vergesellschaftet sind, u.a. auch deshalb, weil sie besser auf Radio- und/oder Chemotherapie anzusprechen scheinen [10, 21] (s.a. 2.4.3.: „Strategien der Tumorevasion und Besonderheiten HPV-positiver PECA“). Entsprechende innovative Diagnostik, wie spezielle immunhistochemische Färbungen, ist hier Gegenstand aktueller Forschung und Entwicklung.

2.3. Bedeutung der pathologischen Diagnostik bezüglich der Tumorklassifikation

2.3.1. Tumorklassifikation

Zur Klassifikation eines Tumors gehören Aussagen zu Tumortyp, Lokalisation sowie Dignität und damit die Zuordnung zu einem Ausgangsgewebe ebenso wie die Erfassung des Differenzierungs- und Ausbreitungsgrads der Neoplasie.

Voraussetzung für jeden gewissenhaften und evidenten Therapieansatz stellt die Zuverlässigkeit der Diagnosesicherung, insbesondere durch die histologische Verifizierung dar, da hiervon entscheidend Kriterien bezüglich Prognose sowie Art und Ausmaß einer Therapie abhängig sind [1].

Eines der bekanntesten Systeme zur Beurteilung maligner Tumorerkrankungen ist die TNM-Klassifikation. Die drei Buchstaben stehen dabei für die drei Hauptkategorien:

T: Tumorausdehnung

N: Lymphknotenbefall (*lat. nodus*)

M: Metastasierung

Für jede dieser Kategorien wird nochmals eine Subklassifizierung vorgenommen, die in Abhängigkeit von der ICD-10-Nummer konkretere Aussagen zur jeweiligen Tumorgroße, der Anzahl befallener Lymphknoten sowie einer etwaigen Fernmetastasierung erlaubt. Zudem wird bei der TNM-Klassifikation differenziert, ob es sich um klinische (gekennzeichnet mit einem „c“) oder pathologisch-verifizierte Angaben (gekennzeichnet mit einem „p“) handelt. Das TNM-Klassifizierungssystem

wird in regelmäßigen Abständen aktualisiert. Die Subkategorien für die Lokalisationen Mund, Zungenboden, Oropharynx und Hypopharynx wurden für diese Arbeit gemäß der TNM-Klassifikation aus dem Jahr 2017 festgelegt.

2.3.2. Tumor-Grading

Die Tumorgraduierung (*engl.*: Grading) ist die Beurteilung des Malignitätsgrades einer Neoplasie, die anhand von histologischen und zytologischen Charakteristika der Tumorzellen beurteilt wird. Zu den Kriterien gehören Zellpolymorphie mit etwaigen Kennzeichen einer Kernatypie - wie Anisonukleose, Kernhyperchromasie, Nukleolenvergrößerung oder Mitosezeichen - sowie der potentielle Verlust der Polarität von Zellen oder ihrer Entdifferenzierung [1]. Das Grading ergänzt die TNM-Klassifikation, da über den Differenzierungsgrad maligner Gewebe ebenfalls prognostische Aussagen getroffen werden können.

Eine reguläre Einteilung des Differenzierungsgrades ist die Typisierung nach UICC (*frz.*: *Union Internationale Contre le Cancer*). Diese unterteilt Tumorgewebe in die drei Maturationsgrade G1-G3, wobei zwischen sehr gut differenziertem Gewebe, mit starker Ähnlichkeit zum Ausgangsgewebe (i.e. G1), bis hin zu schlecht differenziertem Gewebe (i.e. G3), welches sich durch immunhistochemische Färbungen einem Ursprungsgewebe zuordnen lässt, unterschieden wird. Die Entdifferenzierung nimmt also von G1 bis G3 zu, bis das Tumorgewebe schließlich anaplastisch und somit in hohem Maße aggressiv und maligne ist.

2.3.3. Diagnosesicherung bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs

Oftmals erfolgt in Bezug auf Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches eine Diagnosestellung erst nach subjektiver Beschwerde-Feststellung, wobei der Tumor dann schon meist ein fortgeschrittenes Stadium hat [7, 23]. Zu den Beschwerden, die im Rahmen des Karzinoms von Zunge und Mundboden häufig von Patienten angegeben werden, gehören u.a. Dysphagie und Schmerzen (oft mit brennendem Charakter), Einschränkungen der Zungenbeweglichkeit, *foetor ex ore* oder Fremdkörpergefühl [7]. Die Diagnose wird zumeist - neben den klinischen Angaben - anhand einer Biopsie des Tumorgewebes und - wenn vorhanden - anhand einer Lymphknotenbiopsie sowie bildgebender Verfahren (CT, MRT und Sonographie) gemäß AWMF-Leitlinie gestellt.

Bei Malignomen des Oropharynx (Tonsille, Zungengrund) kommt es nicht selten zu Beeinträchtigungen der Sprache, Otalgie, Schwellungen im Bereich des Halses oder (meist einseitigen) Schluckbeschwerden [7]. Die Diagnosestellung erfolgt in Analogie zu PECA des Mundbodens und der Zunge.

Beim Hypopharynxkarzinom treten klinische Symptome - wie bei allen anderen PECA des Kopf-Hals-Bereiches - ebenfalls erst spät auf. Neben den o.g. Symptomen kann es zu Heiserkeit bei Befall der Aryknorpel kommen. Diagnostisch wird ergänzend zu den o.g. Untersuchungen die Spiegeluntersuchung durchgeführt, die ggf. um eine endoskopische Untersuchung ergänzt werden muss.

Aufgrund einer zeitlich schnelleren Lymphknotenmetastasierung im Vergleich zu anderen Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs, wird das Hypopharynxkarzinom meist etwas früher diagnostiziert. [3].

2.4. Tumorimmunologie

2.4.1. Abwehrmechanismen gegen transformierte Zellen

Die Tumorimmunologie ist eine Disziplin, die sich damit beschäftigt, welchen Einfluss das Immunsystem des Menschen auf die Genese, den Progress und die Elimination von Tumoren hat.

Die Zellen des menschlichen Organismus unterliegen täglich zahlreichen schädlichen Einflüssen. Im menschlichen Körper gibt es jedoch Kontrollinstanzen, die verhindern, dass jeder schädliche Einfluss auch eine Mutation innerhalb des Genoms bedingt. Diese Kontrollinstanzen finden sich als Bestandteil des Zellzyklus, dessen primäre Funktion darin besteht, einen koordinierten Ablauf der Zellteilung und -proliferation zu gewährleisten, um letztlich die uniforme Bildung und Erneuerung funktionsfähiger Gewebe sicherzustellen.

Innerhalb des Zellzyklus wird über die Restriktionspunkte geprüft, ob Schäden der DNA vorliegen und ob diese reparabel sind oder der programmierte Zelltod i.S. einer Apoptose eingeleitet werden muss. Genetisch veränderte Zellen werden somit daran gehindert, sich durch Zellteilung zu vermehren.

Akkumulieren schädliche Einflüsse oder liegen z.B. im Rahmen anderer Erkrankungen bereits Schädigungen des Genoms vor, kann es trotz Zellzyklus-Kontrollen zu

Mutationen kommen. Diese führen dann oftmals zu Veränderungen von Tumorsuppressorgenen oder Protoonkogenen, die normalerweise regulierend in die Proliferation von Zellen eingreifen; mit dem Ergebnis, dass sich die transformierte Zelle ungehindert teilt.

Im Blut und in den lymphatischen Organen des Menschen findet sich eine sekundäre Kontrolleinrichtung – die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. Die adaptive Immunantwort basiert auf einem empfindlichen Gleichgewicht zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Signalen [24]. Tumorzellen sind auf ihrer Oberfläche - wie jede andere Zelle auch - mit Antigenen ausgestattet [25], die es dem Immunsystem ermöglichen, zwischen körperfremd und -eigen zu unterscheiden. Antigen-präsentierende Zellen (APZ), z.B. Makrophagen, können über ganz unterschiedliche Rezeptoren Antigene auf der Oberfläche von Tumorzellen, die als Liganden dienen, erkennen, phagozytieren und intrazellulär fragmentieren [14]. Einzelne Fragmente der phagozytierten Tumorzellen werden dann mit Hilfe von MHC-Molekülen und Antigen B7-Kostimulation den T-Lymphozyten im Blut durch Bindung an den T-Zell-Rezeptor (TZR) und CD28-Kostimulation präsentiert. Sobald die Antigenerkennung erfolgt, verstärkt das CD28-Signal das TZR-Signal zur Aktivierung von T-Zellen [26]. Der so aktivierte T-Lymphozyt proliferiert daraufhin und differenziert sich in T-Helferzellen (CD4-positiv) oder zytotoxische T-Zellen (CD8-positiv) mit Effektorfunktion. Bei einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen kommt es im Falle einer CD4-Aktivierung zur Interleukinproduktion mit nachfolgender Aktivierung von Plasmazellen bzw. Antikörper-Klassensprung, wobei statt IgM vermehrt IgG bzw. IgE sezerniert wird; oder im Falle einer CD8-Aktivierung zur Zytolyse. Letztere dient der Erkennung und Elimination von entarteten oder infizierten Körperzellen.

Die T-Zellaktivierung stellt demnach einen wichtigen Schnittpunkt der Immunkontrolle dar, deren endgültiges Ausmaß und Qualität durch das sensible Gleichgewicht co-stimulatorischer und -inhibitorischer Signale reguliert wird [26]. Erst die Co-Stimulation über das CD28-Signal bedingt - wie bereits erläutert - die T-Zell-Expansion und -Differenzierung naiver T-Zellen zu T-Effektorzellen [16]. Ist das co-stimulatorische Signal nicht stark genug, verbleibt die T-Zelle in einem anergischen Zustand mit Induktion der T-Zelltoleranz [24]. Nach der initialen T-Zellaktivierung werden auch co-inhibitorische Moleküle aktiv, die derselben entgegenwirken [24] und so das Ausmaß der Immunaktivierung begrenzen. Die Balance zwischen aktivierenden und

inhibitorischen Signalwegen ist letztlich entscheidend zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und Gewebeprotektion, wenn das Immunsystem auf schädliche Veränderungen reagiert [26] und im Rahmen dessen selbst zytotoxische Stoffe produziert und freisetzt. Maßgeblich für das Gleichgewicht o.g. Signalwege sind Mitglieder der B7-Familie [24] sowie das *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA-4), einem wichtigem Immunkontrollpunktzeptor, welcher durch Bindung von B7-Molekülen auf APZ generiert wird [24, 27]. In den letzten Jahren wurden fünf neue Mitglieder der B7-Familie identifiziert, welche die Proliferation und Reifung von T-Zellen (das sogenannte *priming*) kontrollieren. Zu diesen gehören: B7-H1 (*syn. PD-L1: programmed death receptor-ligand 1*), B7-DC (*syn. PD-L2: programmed death receptor ligand 2*), B7-H2, B7-H3 und B7-H4 [24]. Alle diese B7-Mitglieder besitzen immunsuppressive Eigenschaften und interferieren möglicherweise negativ mit der co-stimulatorischen Immunantwort des Wirts, was im Kontext eines malignen Prozesses zur Progression führen kann [24].

CTLA-4 gehört zu den am besten erforschten Immunkontrollpunktzeptoren ebenso wie PD-1. [26]. Der CTLA-4 Rezeptor nutzt - wie auch CD28 - Liganden der B7-Familie auf der Oberfläche von T-Zellen und führt zu einer Begrenzung der T-Zellaktivierung, indem er der Aktivität und somit einer T-Zell-Co-Stimulation von CD28 entgegenwirkt [28], vgl. Abbildung 1 [29]. Die Folge ist eine Begrenzung der Immunantwort, durch Expansionslimitierung eines ruhenden Pools an CD4+-T-Zellen und Erhöhung der Diversität des TZR-Repertoires [30].

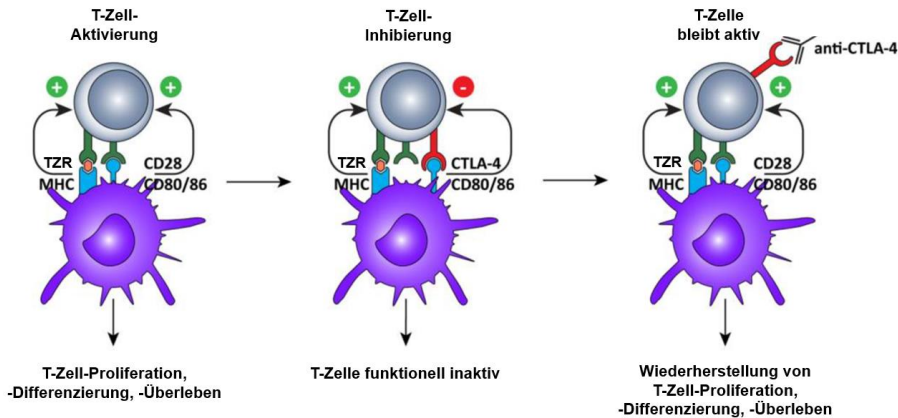


Abbildung 1: Wiederherstellung der T-Zellaktivierung durch CTLA-4-Blockade.

Nach Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch den TZR wird das 2.Signal für die T-Zellaktivierung durch Bindung an CD80 oder 86 auf T-Zellen präsentiert. Diese Interaktion führt zur Oberflächenexpression von CTLA-4, welches eine höhere Affinität zu CD80/ 86 hat und das Aktivierungssignal unterbricht. Außerdem führt dieses Signal durch CTLA-4 zu verminderten T-Zellfunktionen und inhibiert eine exzessive Ausbreitung aktivierter T-Zellen. Monoklonale anti-CTLA-4-Antikörper binden an CTLA-4 und blockieren die Interaktion mit CD28, welches erneut frei ist, um mit CD80/ 86 zu interagieren, die T-Zellaktivierung zu verlängern und T-Zell-vermittelte Immunität gegen Tumoren zu verstärken [29].

PD-1 ist ein immuninhibitorischer Rezeptor, der physiologisch von aktivierten T- und B-Zellen sowie myeloischen Zellen und Makrophagen exprimiert wird [26, 31]. Im Vergleich zu CTLA-4 reguliert PD-1 prädominant die Effektor-T-Zell-Aktivität [26]. PD-1 interagiert dabei mit den Liganden PD-L1 und PD-L2, die nicht nur von APZ exprimiert werden, sondern auch von Zellen nicht-lymphoider Gewebe, wie z.B. Herz, Lunge, Plazenta oder Skelettmuskulatur [32], [28].

2.4.2. PD-1 und seine Liganden - Aufbau und Funktion

Maßgebend für die Signalwege co-inhibitorischer Rezeptoren ist die Modifizierung von Antigen-Rezeptorsignalen [33]. PD-1 ist durch seine negativ regulatorische Funktion und Interaktion mit seinen Liganden, PD-L1 und PD-L2, wichtig für die Induktion und Aufrechterhaltung der T-Zell-Toleranz [32, 33]. Das Ausmaß dieser inhibitorischen Wirkung hängt von der Stärke des T-Zell-Rezeptorsignals ab. Der hemmende Effekt ist dabei offenbar deutlich ausgeprägter, wenn die T-Zellrezeptorstimulation nicht zu intensiv ist [33].

Der PD-1:PD-L1-Signalweg kann eine Signalkaskade zwischen APZ und T-Lymphozyten limitieren, indem die Expression von Transkriptionsfaktoren, die mit Effektorzellfunktionen assoziiert sind - z.B. GATA-3 - vermindert bzw. aufgehoben werden [33]. Eine supprimierte Effektorzellfunktion resultiert letztlich in einer

reduzierten Produktion von Zytokinen, wie Interleukin-2 (IL-2), Interferon-gamma (INF-gamma) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) sowie Oberflächenproteinen wie Bcl-xL [33].

Dem Immunsystem gelingt es schließlich über Immunkontrollinstanzen wie dieser einerseits überschießenden Entzündungsreaktionen vorzubeugen und andererseits eine gezielte und limitierte Elimination schädlicher Einflüsse zu gewährleisten [26]. Diese Annahme wird u.a. dadurch gestützt, dass bei Versuchen an Mäusen ein Defizit von PD-1 zu einem Zusammenbruch der peripheren Toleranz und Begünstigung verschiedener Autoimmunerkrankungen führte [32]. In diesem Zusammenhang spielt der strukturelle Aufbau von PD-1 und PD-L1 eine zentrale Rolle.

2.4.2.1. Struktureller Aufbau von PD-1

PD-1 findet sich beim Menschen auf dem Chromosom 2 und ist durch das *Pcdc*-Gen kodiert [32]. Es handelt sich um ein Protein, das der CD28-Familie zugehörig ist. Der Rezeptor findet sich bei verschiedenen Immunzellen, nicht jedoch bei ruhenden T-Zellen und kann induziert exprimiert werden [33]. Es handelt sich um ein Typ I-Transmembranprotein, das 288 Aminosäuren umfasst und den Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet wird [33]. Dieses Oberflächenprotein setzt sich zusammen aus einer extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen variablen Domäne, einem 20 Aminosäuren umfassenden Stiel, einer Transmembran- und intrazellulären Domäne mit einem Immunrezeptortyrosin basierenden *Switch-Motiv* [32, 33].

Verantwortlich für die Herunterregulation des Antigen-Rezeptorsignals, und somit das Ausbleiben einer T-Zellaktivierung, sind zwei intrazelluläre, phosphorylierte Tyrosine, die durch Bindung an Phosphatasen eine direkte Dephosphorylierung von Zwischenprodukten des PD-1-abhängigen Signalwegs bewirken [33]. Es gibt zwei Phosphatasen, die an bestimmte Motive von PD-1 binden können; das sind SHP-1 und SHP-2. Es wird vermutet, dass SHP-2 als eine Art Brücke für den Signaltransfer zwischen PD-1 und dem TZR agiert und PD-1 seine inhibitorischen Effekte wahrscheinlich nur durch direkte Interaktion mit SHP-2 vermitteln kann [33]. Dazu ist es wichtig, dass die PD-1-Bindung an einen PD-Liganden, auf der Oberfläche von APZ, in enger topographischer Beziehung zum Antigen-Rezeptor erfolgt [33]. Diese Hypothese wird ferner dadurch untermauert, dass die Vernetzung von PD-1 und dem TZR die Menge an SHP-2 erhöht [33, 34].

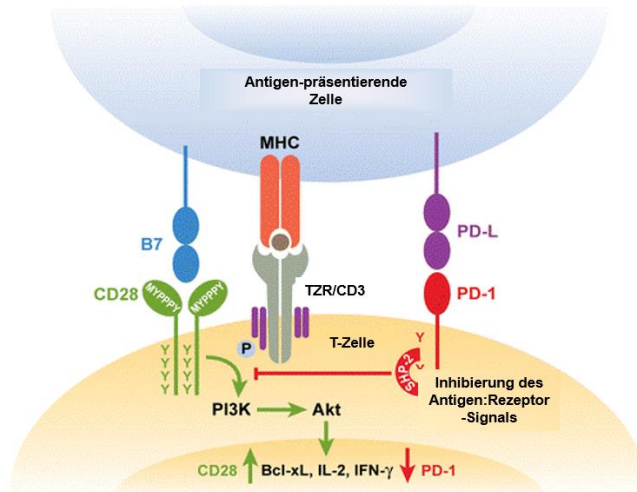


Abbildung 2: Bindung von PD-1 dämpft das TZR-Signal, kann jedoch durch CD28-Costimulation überwunden werden.

Die PD-1-Bindung auf der Zelloberfläche führt zu einer Phosphorylierung von zytoplasmatischen PD-1-Tyrosinen und verstärkt die Verbindung zwischen SHP-2 und ITMS von PD-1. Die Rekrutierung von SHP-2 dephosphoryliert die Signalkaskade über PI3K und vermindert nachfolgende Effekte durch Akt. PD-1 vermindert dadurch letztlich die Induktion von Zytokinen, wie INF-gamma und überlebenswichtigen Proteinen für die Zellen, wie z.B. Bcl-xL. Wenn das Signal durch CD28 zur selben Zeit wie PD-1 und die TZR-Bindung dargeboten wird, können inhibitorische Effekte überwunden und die Zytokinproduktion sowie das Zellüberleben gesteigert werden [33].

PD-1 und CTLA-4 ähneln sich im Hinblick auf ihre strukturellen Eigenschaften [32]. Beide verfügen über eine eigene, variable Immunglobulin-Domäne mit einer jeweiligen Übereinstimmung von 23% [32] und können von den co-stimulatorischen Rezeptoren B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) gebunden werden. Die Bindung von CD80 und CD86 stimuliert und unterstützt T-Zellantworten, wohingegen Interaktionen zwischen B7-Molekülen und CTLA-4 T-Zellantworten inhibiert werden [34].

Wie sich herausstellte, besteht eine strukturelle Verwandtschaft von PD-L1 und den B7-Molekülen [32].

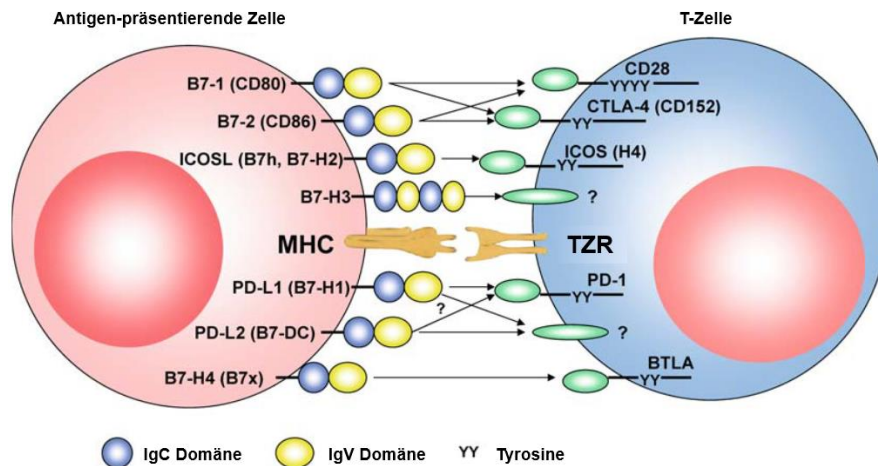


Abbildung 3: Die wachsende Zahl von B7-Molekülen beeinflusst das TZR-Signal.

Die wachsende Zahl an B7-Molekülen beeinflusst das TZR-Signal. CD28 und CTLA-4 haben MYPPPY-Motive, welche essenziell sind, um B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) zu binden. B7-1 und B7-2 bieten wichtige costimulatorische Signale über eine Interaktion mit dem konstitutiv exprimierten CD28 und negative Signale über CTLA-4 (CD152), welches durch die T-Zellaktivierung induziert wird. ICOS (H4) zeigt keinerlei Bindungsvermögen zu B7 und scheint costimulatorische Effekte auf kürzlich aktivierte T-Zellen und Effektor-T-Zellen, die an ihren Liganden ICOS-L (B7h, B7-H2) binden, zu vermitteln. B7-H3 wird konstitutiv auf INF-gamma-behandelten dendritischen Zellen exprimiert und bindet an einen nicht identifizierten Rezeptor auf aktivierten, aber nicht ruhenden T-Zellen. B7-H3 costimuliert die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. PD-L1 (B7-H1) reguliert negativ die Proliferation und Zytokinproduktion auf T- und B-Zellen, welche PD-1 auf Aktivierung exprimieren. Ein zweiter Rezeptor, welcher costimulatorische Signale von PD-L1 vermittelt, wurde postuliert, jedoch bislang noch nicht identifiziert. Dieser interagiert womöglich bevorzugt mit PD-L2 (B7-DC). Über B7x (B7-H4) wurde berichtet, dass Interaktion mit BTLA stattfindet, welches von aktivierten T- und B-Zellen exprimiert wird. Dies führt zu einer Inhibierung der Lymphozytenaktivierung führt. Im Gegensatz zu den hier gezeigten APZ zeigen die meisten Tumoren einen Mangel an costimulatorischen B7-Molekülen und exprimieren in hohem Maße PD-L1, entweder konstitutiv oder getriggert durch INF-gamma. Diese Expressionsmuster verschieben die costimulatorische Balance zwischen TZR und Inhibition tumorspezifischer T-Zellen während der Interaktion mit den Tumorzellen [25].

2.4.2.2. Struktureller Aufbau und Vorkommen von PD-L1

PD-L1 ist ein 290 Aminosäuren umfassendes Transmembranprotein, welches der B7-Familie zugerechnet wird und das beim Menschen durch das Cd274-Gen auf dem Chromosom 9 kodiert wird [32, 33]. B7-H1, wie PD-L1 auch genannt wird, besteht aus einer variablen (IgV) und einer konstanten (IgC) Domäne im extrazellulären Bereich und ist dem PD-L1 von Mäusen damit strukturell sehr ähnlich [24, 35]. Eine hydrophobe Transmembrandomäne folgt einer kurzen intrazellulären Region [32]. Strukturelle Ähnlichkeiten bestehen mit 21% Übereinstimmung zu B7-1, mit 20% zu B7-2 und mit 23% zum induzierbaren Co-Stimulator (ICOS) [32].

PD-L1, B7-1 und B7-2 werden von APZ co-exprimiert [32]. Daneben wird PD-L1 auch von Interferon-produzierenden Monozyten, dendritischen Zellen und nicht lymphatischen Geweben - wie z.B. Herz und Lunge - gebildet, wodurch es zu einer Begrenzung der Immunantwort im Rahmen einer Entzündungsreaktion und Vermeidung von Autoimmunität kommt [32].

In den letzten Jahren konnte ferner die Expression von PD-L1 auf verschiedenen soliden Tumoren nachgewiesen werden. Zu diesen Tumoren gehören beispielsweise maligne Melanome, Kolonkarzinome, nicht-kleinzellige Lungenkarzinome sowie PECA von Kopf und Hals [27, 31, 36-38]. Es wird angenommen, dass PD-L1 diesen Tumoren eine Art Flucht vor der Kontrolle des Immunsystems erlaubt [28, 39].

2.4.2.3. *Cluster of differentiation*: Unterstützer im Rahmen von Immunantworten

Cluster of Differentiation (CD) sind immunphänotypische Zell-Oberflächenmerkmale. Es handelt sich zumeist um membrangebundene Glykoproteine mit unterschiedlichen Funktionen, nach denen sie biochemisch und funktionell unterteilt werden können. CD-Molekülen kommt eine entscheidende Rolle bei der intra- und interzellulären Signalvermittlung insbesondere im Rahmen von Entzündungsprozessen sowie bei einer Reihe von enzymatischen Reaktionen zu.

CD3 ist ein Proteinkomplex auf der Oberfläche von Thymozyten sowie von ruhenden und aktivierten T-Lymphozyten, der im Rahmen der Signaltransduktion bei der Aktivierung von T-Zellen eine zentrale Rolle einnimmt, weshalb CD3 auch T-Zell-Rezeptor genannt wird [40]. CD3 erscheint zuerst im Zytoplasma von Thymozyten und wird im weiteren Verlauf des Lebens in die Zellmembran von medullären Thymozyten und T-Zellen integriert, wo es MHC-Moleküle, die Antigenfragmente präsentieren, bindet [40]. Durch diese Ligation kommt es zur Aktivierung der T-Zellen. Von zentraler Bedeutung ist CD3 beispielsweise bei der Diagnosestellung der akuten lymphatischen Leukämie oder zur Differenzierung von nicht-T-Zell-lymphomatoiden Malignitäten versus T-Zellen-Neoplasmen im Rahmen der Immunhistochemie [41, 42]. Wie eine Metaanalyse von De Ruiter et al zeigte, scheinen PECA der Kopf-Hals-Region, die einen hohen Anteil an CD3-positiven Lymphozyten vorweisen, mit einem besseren klinischen Outcome assoziiert zu sein [43].

CD4 ist ein Co-Rezeptor, der unter Anwesenheit von CD3 an der Erkennung von Antigenfragmenten über MHC-II-Moleküle beteiligt ist, indem es an die MHC-II-Moleküle bindet [44, 45]. Erst durch die Antigenerkennung werden letztlich weitere Signalkaskaden zur Aktivierung von Immunzellen in Gang gesetzt. CD4 wird von Thymozyten, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Langerhanszellen und T-

Helferzellen exprimiert [44, 45]. Die Rolle von CD4-positiven T-Helferzellen ist bis heute nicht abschließend geklärt, da es sehr viele Subtypen CD4-positiver Zellen mit ganz unterschiedlichen Funktionen gibt [43]. Eine dieser Funktionen ist z.B. die Stimulierung CD8-positiver zytotoxischer Zellen zur Erzeugung einer antitumoralen Immunantwort. Andererseits existieren regulatorische CD4-positive T-Zellen, die eine effektive Immunabwehr gegen einen Tumor verhindern [43]. Für PECA des Kopf-Hals-Bereiches scheint CD4 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten jedoch ein guter prognostischer Marker für den Therapieerfolg zu sein [43].

CD8 ist ein Co-Rezeptor, der von zytotoxischen T-Zellen sowie in geringem Maße von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert wird [43]. Seine Funktion besteht in der Bindung von MHC-I-Molekülen auf APZ [45, 46]. Durch Bindung dieser Moleküle erkennen CD8-positive Zellen fremde Antigene. Die zytotoxische T-Zelle wird bei gleichzeitigem Vorliegen eines Co-Stimulators auf der APZ aktiviert und bewirkt im Anschluss daran direkt die Elimination derselben [43, 45]. Von zentraler Bedeutung ist dieser Prozess bei der Erkennung und Vernichtung von Tumorzellen oder virusbefallenen Zellen [46], da Tumoren, die CD8-positive Lymphozyten im Entzündungsinfiltrat bzw. der direkten Tumorumgebung enthielten, mit einer besseren Prognose für ganz verschiedene Tumoren assoziiert waren [43].

CD56 (syn. *neural cell adhesion molecules*, NCAM) ist ein Zelladhäsionsmolekül an der Membran von Neuronen [47, 48]. Höchst wahrscheinlich spielt CD56 eine wichtige Rolle bei der Kommunikation und Interaktion von Nervenzellen und NK-Zellen [47, 49]. Eine Untergruppe aktivierter T-Lymphozyten exprimiert ebenfalls CD56 [49]. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass NCAM-positive Tumoren - z.B. das Multiple Myelom [48] oder das hepatozelluläre Karzinom [50] - aggressiver zu sein scheinen als NCAM-negative [49, 51]. Als Komponente einiger Entzündungsinfiltrate wird CD56 in der histologischen Diagnostik somit ebenfalls regelmäßig bestimmt.

CD68 ist ein stark glykosyliertes Glykoprotein auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und anderen Phagozyten. [52, 53]. Üblicherweise wird CD68 als ein immunhistochemischer Marker zur Detektion von Makrophagen und Monozyten bei der Analyse von Tumoren und entzündlichen Gewebeprozessen genutzt [53]. Tumoren beeinflussen das sie umgebende Mikromilieu und somit das Entzündungsinfiltrat, welches sich bei längerem Fortbestehen eines Malignoms verändern kann [53]. Initial proinflammatorische CD68-positive Makrophagen können

dabei phänotypisch in einen antiinflammatorischen Status gebracht werden, und werden dann auch als TAM (i.e. tumorassoziierte Makrophagen) bezeichnet, die die Fähigkeit besitzen, die zytotoxische Aktivität von CD8-positiven Zellen in Tumoren zu inhibieren [53]. Ferner scheint eine stärkere Expression von CD68 von Zellen des Tumorstromas für gewöhnlich mit einem höheren Tumorstadium, schnellerer Progression und Aggressivität verbunden zu sein [53]. In einer Studie, welche die Bedeutung von CD68 bei Gliomen untersuchte, konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Suppression T-Zell-vermittelter Immunität zu spielen scheint. Darüber hinaus scheint eine Assoziation zwischen CD68 mit anderen Makrophagen-Oberflächenmarkern und Immunkontrollpunkten, darunter auch PD-1, zu existieren [54]. In Kombination mit anderen immunhistochemischen Markern stellt CD68 einen Prädiktor für das Überleben von Patienten dar [53-57]; nicht zuletzt gerade deshalb, weil Monozyten und Makrophagen die häufigsten tumorinfiltrierenden Zellen sind und sich an der Generierung einer antitumoralen Immunantwort beteiligen [11, 53, 56].

2.4.3. Strategien der Tumorevasion und Besonderheiten HPV-positiver PECA

Die verschiedenen Arten von Immunzellen haben einen ganz unterschiedlichen Einfluss auf die Tumorprogression und können mitunter mit dem Tumor harmonieren [58]. Die Infiltration von Tumoren durch Zellen des Immunsystems ist äußerst heterogen und unterscheidet sich nicht nur im Hinblick auf die Lokalisation der verschiedenen Tumoren, sondern auch in Bezug auf ihr jeweiliges Ausgangsgewebe [58]. Immunzellen können sich im Zentrum eines Tumors, in dessen invasivem Randbereich oder in assoziierten benachbarten Regionen, wie den Lymphknoten, ansiedeln [58]. Die Dichte, Lokalisation und funktionelle Ausrichtung der Immunzellen nehmen dabei Einfluss auf die Beschaffenheit des Immunsystems und somit auf die Qualität einer Immunantwort [58].

Eine starke Infiltration des Tumors durch Lymphozyten scheint mit einem besseren klinischen Ergebnis assoziiert zu sein, wobei insbesondere eine starke Assoziation zwischen hohen Dichten an CD3-positiven T-Zellen und zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen vorzuliegen scheint [58]. Nicht zuletzt hängt die körpereigene Bekämpfung von entarteten Zellen durch das Immunsystems auch vom lokalen Anschluss an das

Blut- und Lymphgefäßsystem ab [58]. VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) bewirkt als Hauptinduktor eine Neovaskularisation des Tumors und darüber hinaus eine Ausreifungshemmung dendritischer Zellen, mit der Folge einer unterdrückten Immunantwort [58]. Die Neovaskularisation steht auch im Zusammenhang mit einigen Proteoglykanen auf der Oberfläche von Tumorzellen. Durch Modifizierung bestimmter Proteoglykane kann neoplastischen Zellen eine Art Maskierung vor der Kontrolle des Immunsystems gelingen [59]. Wie in einer Studie bereits demonstriert werden konnte, können epitheliale Zellen der Mundhöhle und des Oropharynx die Transkription und Translation praktisch aller bisher bekannten Oberflächen-Proteoglykane modifizieren. Darunter SDC1, dessen Expression stark mit dem Differenzierungs- und somit dem Malignitätsstatus von Tumoren korreliert [59]. Ein erhöhter Gehalt an SDC1 scheint ein Indikator für das Vorliegen von Fernmetastasen zu sein und das Vorkommen von SDC2 - ein weiteres Proteoglykan - korreliert offenbar mit der Bildung von Lymphknotenmetastasen und dem Gesamtüberleben [59].

Mehrere Studien postulieren, dass dem Mikromilieu eines Tumors eine aktive Rolle bei der Progression von Neoplasien zukommt, wobei in diesem Kontext insbesondere Myofibroblasten von besonderer Bedeutung zu sein scheinen, da diese mit einem aggressiveren, neoplastischen Verhalten assoziiert sind [60]. Myofibroblasten wurden auch im Stroma von PECA des Kopf-Hals-Bereiches detektiert [60]. Dies verwundert in Anbetracht der Aggressivität dieser Tumoren wenig. Myofibroblasten scheinen bei dieser Art von Tumor signifikant mit der Rate an Lymphknotenmetastasen und letztlich der finalen Verlaufsprognose in Assoziation zu stehen; vermutlich auch aufgrund einer gesteigerten Sekretion von Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren [60].

Zytokine wie IL-2, IFN-gamma oder TNF-alpha sind von zentraler Bedeutung für die Bekämpfung schädlicher Einflüsse und Entartung von Zellen, da sie nicht nur zur Chemotaxis und Leukozytendiapedese, sondern auch zur direkten Lyse von Zellen oder Mikroben führen können. Interessanterweise fällt die IFN-gamma und IL-10-Sekretion in Gegenwart von PD-L1 erheblich ab [31, 32], was möglicherweise den inhibitorischen Effekt der PD-1:PD-L1-Signalkaskade durch eine Herunterregulation der Immunantwort widerspiegelt [31].

2.4.3.1. Tumorevasion über den PD-1:PD-L1-Signalweg

Es ist inzwischen bekannt, dass Tumoren ihren Phänotyp durch Expression verschiedener Moleküle verändern können [25, 26]. Dazu gehören beispielsweise CTLA-4-Liganden und PD-L1 [25]. Es wurde beobachtet, dass die Transfektion von PD-L1 in PD-L1-negative humane Melanomzellen zu einem verminderten Prozentsatz an apoptotischen Zellen führte und demnach mehr maligne Zellen überlebten [25]. Eine starke Expression von PD-L1 in humanen Tumoren führte daher zu der Annahme, dass der PD-1:PD-L1-Signalweg die Flucht vor tumorspezifischen T-Zellen ermöglichen könnte. Der Mechanismus scheint dabei derselbe zu sein wie im Rahmen des co-inhibitorischen Signals während der T-Zellaktivierung. Vereinfacht ausgedrückt, gibt der Tumor vor, Teil des Immunsystems zu sein, indem durch Expression von tumoralem PD-L1 und Bindung an PD-1 auf T-Zellen eine Aktivierung derselben und somit die Eliminierung neoplastischer Zellen ausbleibt [25]. Gesundes Gewebe zeigt nur eine minimale Oberflächenexpression von PD-L1, wohingegen viele Tumoren einen hohen PD-L1-Expressionsstatus aufweisen. Hierbei scheint die Expression durch Wirkung von INF-gamma positiv beeinflusst zu werden [25] und sogar ein Hauptinduktor für die PD-L1-Expression zu sein [30]. Wie für PECA von Kopf und Hals als auch für andere solide Tumoren gezeigt werden konnte, aktivieren v.a. T-Helferzellen, die den Tumor infiltrieren, eine INF-gamma-vermittelte Signalkaskade sowie die induzierte Expression von PD-L1 auf Zellen der Tumorumgebung [36].

2.4.3.2. Besonderheiten HPV-positiver PECA des Kopf-Hals Bereichs

Bei der Genese von PECA des Kopf-Hals-Bereiches kommt der Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) eine besondere Rolle zu. HPV stellen eine Gruppe von DNA-Viren dar, die der Familie der Papillomaviridae zugeordnet werden und von denen mehr als 100 verschiedene Typen bekannt sind. Sie infizieren Epithelzellen von Haut und Schleimhäuten und können in den infizierten Zellen zu tumorartigen Veränderungen führen. Die Interaktion von PD-1 mit seinem Liganden PD-L1 scheint bei diesen Tumoren an der Erzeugung einer immunprivilegierten Stelle der Virusinfektion sowie einer adaptiven Immunresistenz beteiligt zu sein [61]; ihr Expressionsstatus ist deutlich erhöht gegenüber virusfreien Läsionen [62]. Es wird angenommen, dass HPV-Infektionen für mehr als 80% der oropharyngealen

Neoplasien in den USA verantwortlich sind [61]. Hierbei unterscheiden sich HPV-positive deutlich von HPV-negativen Tumoren. Drei wesentliche Charakteristika können in diesem Zusammenhang hervorgehoben werden:

1. Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren sind im Durchschnitt jünger als solche mit HPV-negativen.
2. Bei den meisten HPV-positiven Patienten mit einem PECA des Kopfes und Halses lässt sich kein übermäßiger oder chronischer Alkohol- oder Tabakkonsum in der Vergangenheit eruieren.
3. Patienten, mit HPV-positiven Tumoren zeigen für gewöhnlich ein besseres klinisches Outcome [36, 61, 63].

Der PD-1:PD-L1-Signalweg scheint für die Persistenz einer HPV-Infektion und deren Resistenz gegenüber immunologischen Einflüssen von erheblicher Relevanz zu sein [61]. Virusmanifestation und PD-L1-Expression finden sich in diesem Zusammenhang bevorzugt in tieferen Gewebsschichten [61, 62]. Onkogene HPV exprimieren virale Antigene, die zwar ihrerseits eine deutliche Immunreaktion auslösen können, andererseits aber eine Umgehung der Immunreaktion des Körpers zu begünstigen scheinen, was möglicherweise wiederum mit der Tiefe der Virusinfiltration bzw. -manifestation in Zusammenhang steht [61]. Es wird angenommen, dass eine tiefere Virusinfiltration bessere Möglichkeiten schafft, um die Effektorfunktionen von virusspezifischen T-Zellen herunter zu regulieren [61]. Darüber hinaus scheint PD-L1 die Umwandlung von naiven T-Zellen sowie T-Helferzellen in regulatorische T-Zellen zu begünstigen, was eine Aktivitätszunahme sowie einen anhaltenden, supprimierenden Effekt zur Folge hat [62]. Regulatorische T-Zellen, zu deren Funktionen die Unterdrückung von Effektor-T-Zellen und Hemmung der immunvermittelten Zerstörung gehören, ließen sich vermehrt in Mikromilieus von PECA des Kopf-Hals-Bereiches nachweisen [62]. In diesen Tumoren exprimierten regulatorische T-Zellen, die sich in direkter Nähe zum Tumor befanden, PD-1 und CTLA-4 in einem stärkeren Ausmaß gegenüber denselben Zellen im peripheren Blut und scheinen darüber hinaus deutlich suppressiver zu wirken [35, 62]. Zusammengenommen repräsentiert die selektive Expression von PD-L1 in der Tiefe von Lymphgeweben - wie z.B. Tonsillarkripten - somit möglicherweise eine

immunprivilegierte Lokalisation, in welcher Effektorfunktionen virusspezifischer T-Zellen herunterreguliert sind; was die Umgehung des Immunsystems zum Zeitpunkt einer HPV-Infektion und folglich eine Virus-induzierte maligne Transformation erleichtert [61].

PD-L1 wird nicht nur von Primarien exprimiert, sondern auch von Metastasen und Rezidiven [62]. PD-1 wurde hingegen sowohl bei HPV-positiven als auch HPV-negativen Patienten auf Effektor-T-Zellen detektiert (v.a. CD8-positive Lymphozyten); wobei der PD-1-Expressionsstatus wiederum bei HPV-assoziierten Tumoren deutlich ausgeprägter war als bei HPV-negativen [61, 62]. Darüber hinaus konnte bereits nachgewiesen werden, dass höhere Expressionsraten von CD8-infiltrierenden Lymphozyten signifikant assoziiert waren mit einem schlechteren Gesamtüberleben und höheren Raten an Lokalrezidiven bei HPV-negativen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich, wohingegen es sich bei HPV-positiven Läsionen genau umgekehrt verhielt [62]. Interessanterweise wird PD-L1 nicht uniform in HPV-assoziierten Kopf-Halstumoren exprimiert. Es findet sich topographisch bei Tumorzellen und CD68-tumorassozierten Makrophagen. [61]- Daher wird angenommen, dass PD-L1- und CD68-positive tumorassozierte Makrophagen ggf. eine Art immunprotektive Barriere um Tumorzellnester schaffen, die an der Grenze zwischen Tumorperipherie und angrenzender Entzündungsreaktion des Stromas gefunden werden können [61].

Zusammengefasst bieten Interaktionen zwischen PD-L1 und PD-1 verschiedenen Tumoren - und insbesondere dem PECA von Kopf und Hals - einen wirksamen Schutz vor Apoptose [38] und liefern diesem somit einen äußerst wirksamen Verteidigungsmechanismus zur Selbsterhaltung [30, 62]. Trotz der Infiltration des Tumors durch Effektorzellen des Immunsystems ist das Tumorwachstum selten unter Kontrolle [25]. Die Blockade dieses Signalweges könnte somit ein vielsprechendes Ziel sein, um aggressive Oraltumoren künftig erfolgreicher zu behandeln.

2.4.4. Therapeutische Manipulation des Immunsystems

Bei PECA des Kopf-Hals-Bereiches handelt es sich um Tumorerkrankungen, die insbesondere im rezidierten oder metastasierten Zustand eine äußerst schlechte Prognose aufweisen; nicht zuletzt aufgrund unzureichender bzw. fehlender Behandlungsmöglichkeiten [25, 64]. Die bisherige Erstlinientherapie bei metastasierten oder rezidierten Tumoren dieser Art umfasst die Anwendung einer

chemotherapeutischen Kombinationstherapie aus Cetuximab, Platin und 5-Fluorouracil [36, 64]. Abgesehen davon, dass die Anwendung dieser Medikamentenkombination in aller Regel keinen kurativen Therapieansatz darstellt, weisen insbesondere Zytostatika ein nicht zu vernachlässigendes Nebenwirkungsprofil und starke toxische Belastungen für den erkrankten Körper auf, so dass hier effektivere und zugleich besser verträgliche Behandlungsstrategien wünschenswert sind [64]. Neuere Therapieansätze zielen deshalb darauf ab, das Immunsystem so zu modulieren, dass es maligne Zellen selektiv erkennt und eliminiert [25].

2.4.4.1. Pembrolizumab – ein Checkpoint-Inhibitor

Wie bereits geschildert, können PD-L1 exprimierende Tumoren die T-Zellaktivität herabsetzen und somit eine adäquate Immunantwort unterdrücken [64]. Pembrolizumab ist ein hochaffiner, humanisierter IgG4-monoklonaler Antikörper gegen PD-1, für den in verschiedenen klinischen Studien die Wirksamkeit bei Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren gezeigt werden konnte und der zur Behandlung von nicht resezierbaren oder metastasierten Melanomen bereits zugelassen ist [64, 65]. Als sogenannter Checkpoint-Inhibitor wirkt es durch eine Unterbrechung der PD-1:PD-L1-Signalkaskade; das inhibitorische Signal zur Suppression der T-Zellaktivität bleibt hierdurch aus und führt in der Folge dazu, dass T-Lymphozyten, unter Ausübung aller ihrer natürlichen Funktionen, wieder in die antitumorale Immunabwehr involviert werden [30, 36]. Genauer gesagt, bewirkt Pembrolizumab die Blockade des PD-1-Rezeptors, so dass die Bindungsstelle für PD-L1 besetzt ist und keine Signaltransduktion hierüber erfolgt [36, 62]. Durch eine dadurch bedingte Wiederherstellung der T-Zellaktivierung kann das Tumorwachstum inhibiert werden [36]. Die Effektivität von Pembrolizumab bei Patienten mit PECA der Kopf-Hals-Region konnte in ersten Studien bereits nachgewiesen werden [36, 65]. Bei 61% der behandelten Patienten ließ sich eine Reduktion der Läsionsausgangsgröße nachweisen, was nicht ohne positiven Effekt auf das progressionsfreie bzw. Gesamtüberleben blieb [36, 65]. Für einige Patienten konnte sogar eine initiale Auflösung von Primarius und Fernmetastasen nachgewiesen werden [64].

Von entscheidender Bedeutung für das Ansprechen auf Pembrolizumab scheint das PD-L1-Expressionsniveau auf Immunzellen zu sein, wohingegen offenbar keine

Signifikanz zum PD-L1-Status auf Tumorzellen besteht [36]. Ferner scheint auch der HPV-Status einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit von Pembrolizumab zu haben, da HPV-positive PECA eine stärkere Tumorentzündung sowie PD-L1-Expression aufwiesen [64] und ein höheres Ansprechen auf Pembrolizumab zeigten [36].

HPV-positive PECA stellen Neoplasien dar, die häufig einen relativ hohen Anteil an tumorinfiltrierenden Lymphozyten aufweisen, was ein Erklärungsansatz für den potenten Effekt von Pembrolizumab bei diesen Malignomen sein könnte [64]. Bei einer konsequenten Ansprechrate von 14% und somit Reduktion der Tumorausgangsgröße durch diesen Checkpointinhibitor unter den HPV-negativen Patienten, könnten selbige ggf. dennoch von einer Behandlung mit diesem Immuntherapeutikum profitieren [36]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Pembrolizumab nicht nur eine sehr gute Wirksamkeit hinsichtlich der Behandlung von PECA im Bereich von Kopf und Hals besitzt, sondern insgesamt auch sehr gut von den behandelten Patienten vertragen wurde, die das Medikament in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht alle zwei Wochen erhielten [36]. Insgesamt zeigten 63% der Studien-Teilnehmer Nebenwirkungen irgendeiner Ausprägung [64]; am häufigsten waren dabei Fatigue, Pruritus, Nausea, Appetitlosigkeit, Hypothyreose und Exantheme [36, 64]. Nur wenige Patienten zeigten schwerwiegendere Nebenwirkungen, wie Pneumonie, Diabetes mellitus, Dekubitus oder Colitis [36]. Demnach handelte es sich in den meisten Fällen um milde unerwünschte Arzneimittelwirkungen [36]. Die Sicherheit des Medikaments konnte nicht zuletzt dadurch bewiesen werden, dass behandlungsbedingt kein Patient verstarb [36]. Verglichen mit konventionellen Therapien, die mitunter ein höheres Toxizitätspotential aufweisen und insbesondere auch in Bezug auf den PD-L1-Status von Tumoren, könnte Pembrolizumab in Zukunft vielleicht die bessere Behandlungsoption bei PECA von Kopf und Hals sein [64].

In diesem Zusammenhang stellt sich ferner die Frage, ob PD-1 oder PD-L1 künftig als prädiktive oder prognostische Marker für die Behandlung mit Immuntherapeutika eingesetzt werden könnten [65], um eine größere Antitumor-Aktivität vorhersagen und nutzen zu können [64].

2.5. Fragestellung

Der PD-L1-Expressions-Status von Tumorgewebe stellt eine nicht unerhebliche Rolle für das Ansprechen auf bestimmte Immuntherapeutika, wie Pembrolizumab, dar. Eine größere Antitumoraktivität von Immuntherapeutika konnte für Tumoren mit einer höheren PD-L1-Expression gezeigt werden, was sich in diversen Studien sowohl durch ein verbessertes progressionsfreies Überleben als auch einem verbesserten Gesamtüberleben zeigte.

Die diesbezügliche Studienlage zu PECA des Kopf-Hals-Bereiches ist aktuell jedoch noch dünn.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb:

1. Die Prävalenz PD-L1 positiver Kopf-Hals-Tumoren von Patienten mit PECA zu analysieren und die dazugehörige Immunantwort von PD-1-positiven Lymphozyten zu charakterisieren.
2. Den PD-L1-Status der untersuchten PECA in Assoziation zu den Überlebensdaten der Patienten zu setzen und die Auswirkungen auf klinische Parameter zu eruieren.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Tabelle 1: Arbeitsgeräte

Gerät	Technische Daten	Hersteller/Lieferant
Dampfgarer	Braun 3216	Braun GmbH, Kronberg, D
Färbeautomat für die IHC	Dako Cytomation Autostainer plus	Dako D GmbH, Hamburg, D
Gewebeentwässerungs-automat	Sakura Tissue-Tek VIP 5	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, D
Kapseldrucker	Leica IPC	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Kühlplatte	Medite TKF 22	Medite GmbH, Burgdorf, D
Laborwaage	Sartorius LC 4200	Sartorius AG, Göttingen, D
Magnetrührer	Heidolph MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Objekträgerstrecktisch	Medite OTS 40	Medite GmbH, Burgdorf, D
Paraffineinbettssystem	Medite TES 99	Medite GmbH, Burgdorf, D
pH-Meter	WTW Series InoLab® pH 720	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, D
Pipetten	Eppendorf Reference® 0,5-10µl und 100-1000µl	Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Rotationsmikrotom	Hyrax M55	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Rüttler	Heidolph Unimax 2010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Wärme- und Trockenschrank	Heraeus Function Line UT 6	Thermo-Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D
Tissue Microarray	Pathology Devices TMArray™	Pathology Device in Westminster, Vertrieb durch Formafix, GBR

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Aluminiumsulfat	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Aqua dest.	Medizintechnik, Universitätsmedizin Mainz, D
Dinatriumhydrogenphosphat	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Entellan	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Ethanol absolut	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, D
Ethanol 96%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, D
EnVision™ FLEX/HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK
EnVision™ FLEX/Mouse (LINKER)	Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK
EnVision™ FLEX Antibody Diluent	Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK
EnVision™ FLEX DAB + Chromgen	Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK
EnVision™ FLEX Hematoxylin	Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK
EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking-Reagenz	Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK
EnVision™ FLEX Substrate Buffer	Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK
EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH, pH 9 (50-fach konzentriert)	Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK
EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH, pH 6,1 (50-fach konzentriert)	Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK
EnVision™ FLEX Wash Buffer (20-fach konzentriert)	Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK
Eosin	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Ethylenglycol	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Formaldehyd-Lösung 37%	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Isopropanolol	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Kaliumhydrogenphosphat	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Natriumsulfat	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Paraffin	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, D
Salzsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Xylol	SAV Liquid Productio GmbH, Flintsbach am Inn, D
Zitronensäure	VWR International GmbH, Darmstadt, D

Tabelle 3: Lösungen

Lösung/ Reagenz	Zusammensetzung
Formalin 4%	Phosphatpuffer* 2000 ml Aqua dest. 6600 ml 37%ige Formaldehyd-Lösung 1400 ml
Phosphatpuffer	Dinatriumhydrogenphosphat 67,5 g Kaliumdihydrogenphosphat 45,0 g Aqua dest. 5000 ml pH 6,8 – 7,0 eingestellt mit 1M HCl
Hämalaun nach Gill	Ethylenglycol 250 ml Aluminiumsulfat 42 g Hämatoxylin 4 g Zitronensäure 1,3 g Natriumjodat 0,6 g Aqua dest. ad 1000 ml
Eosin	Eosin 11 g Aqua dest. ad 1000 ml Essigsäure 96% pro 100 ml Lösung 1 Tropfen

Tabelle 4: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Material	Technische Daten	Hersteller/ Lieferant
Deckgläser	24 x 50 mm	Knittel Glass GmbH, Braunschweig, D
Edelstahlgießformen	10 x 10 x 5 mm	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D
Einbettkassetten		Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, D
Magnetrührstäbchen		Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Messzylinder	250 ml	VWR International, Darmstadt, D
Mikrotomklingen	Feather® Mikrotomklingen S35	PFM Medical AG, Köln, D
Objektträger	SuperFrost®	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Pinself		Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover, D
Pinzette, beheizbar	Heidelberger Pinzette	Vogel GmbH & Co. KG, Gießen, D

Tabelle 5: Software

Software	Hersteller/ Lieferant
HALO®	Indica Labs, Albuquerque, New Mexico, USA
Microsoft Office	Microsoft D GmbH, Unterschleißheim, D
PathoPro	ifms GmbH, Saarbrücken, D
Prism 9	GraphPad Software, San Diego, USA
SPSS Statistics 23 V5	IBM D GmbH, Ehningen, D
Tumordatenbank (TuBa)	Hals-, Nasen- Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz, D, programmiert von Maximilian Deichelbohrer

3.2. Methoden

3.2.1. Patientenrecherche

Zu den in der klinischen Praxis auftretenden Tumoren von Kopf und Hals, welche von erheblicher Relevanz sind, gehören unter anderem Karzinome des Naso-, Hypo- und Oropharynx, bei denen es sich zumeist um PECA handelt. Aufgrund dieser Abundanz wurde mittels einer Datenbank nach Patienten gesucht, bei denen in der Zeit von 2005 bis 2009 ein PECA einer der aufgeführten Lokalisationen (siehe Probenauswahl) histologisch nachgewiesen wurde. Andere Kriterien, wie z.B. eine Altersspanne oder das Geschlecht, wurden vorab nicht definiert. Nachdem die entsprechenden Fälle über die Datenbank selektiert und nach mikroskopischer Sichtung verifiziert waren, wurden die klinischen Angaben zu den Patienten ergänzt (s.u.). Hierfür wurde die Tumordatenbank (TuBa), die im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Institut für Allgemeine Pathologie und der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz erstellt wurde, genutzt.

Primäre Zielsetzung der Tumordatenbank ist es, retrospektive und prospektive klinische und histopathologische Kopf-Hals-Tumordaten für statistische Auswertungen zusammenzuführen. Die praktische Kooperation zwischen beiden Instituten hinsichtlich dieser Dissertation bestand darin, dass der Fachbereich HNO die Eingabe klinischer Daten mithilfe der Patientenakten in die TuBa vornahm und das pathologische Institut die histologischen Daten für ihre Fälle ergänzte.

Zu den klinisch erfassten und für die Auswertung relevanten Daten gehörten:

das Datum der Diagnose, das Geburtsdatum des Patienten, das Geschlecht, die Diagnose, die Tumorlokalisierung, die Tumorart, die Therapieform, der Zeitpunkt des Todes bzw. das Datum des letzten Kontakts (zur HNO-Klinik), das TNM-Stadium, das Grading, der R-Status sowie der Alkohol- und Tabakkonsum.

Histopathologische Daten, die für diese Arbeit erhoben wurden, betrafen den PD-1-, PD-L1, CD3-, CD4-, CD8-, CD56- und CD68-Status.

3.2.2. Probenauswahl

Das Ausgangsmaterial umfasste 88 Gewebeproben von PECA des Kopf-Hals-Bereiches aus dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz.

Die Patienten wurden computergestützt über das Programm *PathoPro* für die Jahre 2005 - 2009 ermittelt. Die Software inkludiert unterschiedliche Funktionen und Teilprogramme, welche u.a. die Organisation, Probenannahme, Befunderstellung und Archivierung ermöglichen. Die integrierte Suchfunktion des Programms ermöglicht den Zugriff auf Pathologiebefunde der Universitätsmedizin Mainz. Die Suchanfrage umfasste die Kombination „PECA“ und „ICD-10 Nummer“. Durch die so fokussierte Form der Suchanfrage ergab sich eine Fallzahl von 174 Patienten, von denen - nach mikroskopischer Kontrolle und Sichtung der Schnitte hinsichtlich der Eignung bezüglich Schnittgröße, Tumorgröße, Invasivität und Stromaanteil aus dem Material von 88 Patienten - ein Tissue Microarray (TMA) erstellt wurde.

3.2.3. Gewebepvorbereitung

Bei den Gewebeproben handelte es sich um histologisches Material, das vom Institut für allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz routinemäßig bearbeitet wurde; d.h. das Gewebe wurde standardisiert fixiert, zugeschnitten, zu Paraffinblöcken aufgearbeitet, geschnitten und histochemisch bzw. immunhistochemisch gefärbt.

3.2.4. Herstellung von Tissue Microarrays (TMA)

Da die konventionelle IHC sehr arbeits-, zeit- und z.T. kostenintensiv ist, bietet es sich an, bei einem großen Umfang an Gewebeproben und Patientenkollektiven ein Tissue Microarray anzufertigen [66]. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, das die schnelle Sichtbarmachung von Zielstrukturen auf molekularer Ebene ermöglicht [67]. Ein TMA besteht dabei aus verschiedenen Gewebeproben, die ganz variabel zusammengesetzt und zeitgleich ausgewertet werden können [66-68]. Der Vorteil des TMA besteht zum einen in dem geringen Kosten- und Zeitaufwand, da etliche Gewebeproben in nur einem Paraffinblock untergebracht werden; zum anderen ermöglicht es die vereinfachte, schnellere Beurteilung und Interpretation einer großen Anzahl von Gewebeproben [66, 68, 69].

3.2.4.1. Auswahl der Spenderblöcke

Für die Herstellung von TMA wurde Tumorgewebe aus den zuvor ausgewählten Paraffinblöcken (i.e. Spenderblöcke) ausgestanzt und anschließend in einen leeren Paraffinblock übertragen, der als Empfängerblock für alle Stanzen diente und nach Fertigstellung somit Gewebeausschnitte von allen 88 inkludierten Patienten enthielt. Da die spätere Gewebestanze einen sehr kleinen Durchmesser von gerade einmal 1 mm hatte, sollte der TMA so beschaffen sein, dass möglichst viel Tumorgewebe und wenig Stroma und Nekrose enthalten war.

Die über die Software ermittelten 174 Patientenfälle wurden bzgl. dieser Kriterien auf ihre TMA-Eignung hin untersucht; die ausgewählten 88 Fälle erwiesen sich hierbei als geeignet. An einem mit Hämatoxylin/ Eosin gefärbten Schnitt, der in der Vergangenheit vom pathologischen Institut erstellt und archiviert worden war, wurde das für die Stanzen am besten geeignete Tumoreal mikroskopisch detektiert und auf dem verwendeten Objektträger markiert.

3.2.4.2. Herstellen des Empfängerblocks

Für die Überführung der Tumorgewebe-Stanzen aus dem Spender- in den Empfängerblock war es erforderlich, den Durchmesser der Stanzen vorab zu wählen und die Positionen im noch leeren Paraffinblock entsprechend vorzustanzen. Bereits vor dem Stanzen musste ein Schema erstellt werden, das die Anordnung der Gewebeproben festlegte und darüber hinaus auch den Einbau von Kontrollgewebe berücksichtigte [70]. Anschließend wurden die zuvor gekennzeichneten Gewebeareale aus den Spenderblöcken ausgestanzt und in den Empfängerblock übertragen. Nachdem der Array alle gewünschten Tumorausschnitte enthielt, wurde er für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Erwärmung des Paraffins führte hierbei zu einer Glättung der Oberfläche und ermöglichte so die bessere Anhaftung der Gewebeproben im Empfängerblock.

3.2.5. Erstellung von Paraffinschnitten

Nach vorangegangener Kühlung und Lagerung wurden die Paraffinblöcke in das Rotationsmikrotom eingespannt und 2 µm dicke Schnitte angefertigt, die dann über eine Wasserrutsche in ein Wasserbad glitten, wo sich die Schnitte streckten.

Anschließend wurde der Schnitt mit Hilfe eines befeuchteten Pinsels manuell aufgenommen und auf einen Objektträger überführt. Zur Beseitigung möglicher Lufteinschlüsse und zur definitiven Streckung wurden die Objektträger anschließend auf einen warmen Objektträgerstrecktisch gelegt. Als Ergebnis dieses Prozesses lagen letztlich die noch ungefärbten, paraffinfixierten Schnittpräparate vor. In Vorbereitung auf die sich anschließenden Färbungen und für eine bessere Anhaftung wurde den Schnitten über Nacht bei 37°C die Feuchtigkeit entzogen.

3.2.6. Das Färben der Schnittpräparate

Die Immunhistochemie (IHC) stellt für die moderne histopathologische Diagnostik und Forschung ein wichtiges Werkzeug dar. Durch dieses Verfahren wird es möglich, bestimmte Oberflächenmerkmale von Zellen und Geweben - sogenannte Antigene - mit Hilfe von spezifischen Antikörpern unverkennbar nachzuweisen. Die verwendeten Antikörper sind zu diesem Zweck besonders markiert und können nach Bindung und Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen visualisiert werden; dazu bedient man sich verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, radioaktiver Isotope oder - wie in dieser Arbeit - enzymatischer Reaktionen, die letztlich einen Farbumschlag katalysieren. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe unter Nutzung des Enzyms Meerrettich-Peroxidase, das im Flex Envision™ Kit enthalten ist und für den *Dako Cytomation Autostainer* eingesetzt wird. Das Kit weist primäre Maus- und Kaninchen-Antikörper nach und stellt die Reaktion mittels EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen nach. Die immunhistochemische Färbung erfolgte im *Autostainer* unter Verwendung verschiedener Antikörper (vgl. Tabelle 6Tabelle 6: Antikörper).

Tabelle 6: Antikörper

Antikörper	Hersteller	verwendete Verdünnung
anti-PD1 antibody ab52587	Abcam	1:100
anti-PD-L1 antibody ab213524	Abcam	1:250
anti-CD3 flex polyclonal rabbit REF IR503	Dako	Ready-to-Use
anti-CD4 clone 4B12 flex monoclonal mouse REF IR649	Dako	Ready-to-Use
anti-CD8 clone C8/144B flex monoclonal mouse REF IR623	Dako	Ready-to-Use
anti-CD56 clone 123C3 flex monoclonal mouse REF IR628	Dako	Ready-to-Use
anti-CD68 clone PG-M1 flex monoclonal mouse REF IR613	Dako	Ready-to-Use

Der Vorgang war - bis auf die verwendeten Antikörper und der damit verbundenen Epitopdemaskierung - für alle immunhistochemischen Färbungen analog. Im *Autostainer* waren die Färbeprotokolle für die einzelnen Antikörper sowie die empfohlenen Inkubationszeiten und Protokolle für die Visualisierungssysteme bereits vorprogrammiert.

Im Folgenden sei das Prinzip des *Autostainer*-Färbeprozesses am Beispiel des anti-PD-L1-Antikörpers erläutert:

Für die IHC mussten die Schnittpräparate zunächst entparaffiniert und rehydriert werden; dazu wurden sie für insgesamt 30 Minuten in den Wärme- und Trockenschrank bei 60°C gestellt, damit das Paraffin ablaufen konnte. Die Präparate wurden jeweils dreimalig für 5 Minuten in Xylol gebadet, um das restliche Paraffin aus dem Gewebe zu eliminieren. Für den Prozess des Rehydrierens folgten Bäder in absteigender Alkoholreihe: zwei Bäder für jeweils 5 Minuten in 100% und 96% Ethanol und unmittelbar danach jeweils ein Bad für 5 Minuten in 70% und 50% Ethanol. Abschließend wurden die Schnitte für 3 Minuten mit Wasser gespült. Die Zeit zwischen den einzelnen Bädern wurde zum Erhitzen des Puffers im Dampfgerar genutzt. Dazu wurde der EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution Buffer (pH 6,1, (vgl. Tabelle 2)), der für PD-L1 zum Einsatz kam, auf 94°C erwärmt. Es folgte die Inkubation mit EnVision™ FLEX Peroxidase Blocking Reagent für 5 Minuten, um die endogene Peroxidase zu blockieren und dadurch eine indifferente Hintergrundfärbung zu reduzieren. Eine als positiv für die verwendete Färbung bekannte Kontrollprobe wurde für die Bestätigung aller Reagenzien bei jedem Färbedurchlauf mitgeführt. Zum Zwecke der Epitopdemaskierung wurden die Schnitte anschließend in den erhitzten Puffer überführt und dort für 35 Minuten inkubiert. Zur Reduktion der Oberflächenspannung und letztlich besseren Penetrierbarkeit der Antikörper wurden die Objektträger - nach vorangegangenem Abkühlen unter fließend Wasser - einmalig für 5 Minuten in EnVision™ FLEX Wasch-Buffer (vgl. Tabelle 2) gespült. Im Gegensatz zu den verwendeten CD-Antikörpern, die gebrauchsfertig waren, musste für die Antikörper gegen PD1 und PD-L1 eine Verdünnung hergestellt werden. Der anti-PD-L1-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:250 (vgl. Tabelle 6) pipettiert und 30 min inkubiert. Um eine Austrocknung zu verhindern wurde nochmalig mit EnVision™ FLEX Wasch-Buffer gespült, anschließend der EnVision™ FLEX+ Mouse

(LINKER) pipettiert und für 15 Minuten inkubiert. Es folgte eine nochmalige Spülung mit dem EnVision™ FLEX Wasch-Buffer. Als nächstes wurde das EnVision™ FLEX/ HRP - das gekoppelte Moleküle enthält, die sich gegen die PD-L1 Antikörper richten - aufgetragen, für 20 Minuten inkubiert und erneut zweimalig mit Waschpuffer gespült. Im Anschluss daran wurde zweimal EnVision™ FLEX DAB + Chromogen (1ml Substrat und 1 Tropfen Chromogen) mit einer Inkubationszeit von je 5 Minuten aufgetragen, wodurch die enzymatisch katalysierte Antigen-Antikörper-Reaktion durch einen Farbumschlag (hier von farblos nach braun) am Ort des Zielantigens sichtbar gemacht werden konnte. Durch Verwendung der LINKER-Substanz konnten die Signale der primären Mausantikörper um das Vier- bis Fünffache verstärkt werden.

Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Im letzten Schritt erfolgte die Durchführung einer Hämatoxylin-Färbung zur besseren Darstellbarkeit der Zellkerne. Hierzu wurde EnVision™ FLEX Hematoxylin verwendet (vgl. Tabelle 2). Durch Erhöhung des pH-Wertes durch Spülung mit Leitungswasser kommt es im Anschluss zur einem Farbumschlag nach blau-violett. Durch wiederholte Spülungen mit Alkoholen in aufsteigender Konzentration wird Wasser aus dem Gewebeschnitt verdrängt und so für eine anschließende Konservierung vorbereitet. Nach Klärung des Gewebeschnitts mit Xylol erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit Entellan auf Objektträgern. Diese wurden mittels Deckgläsern verschlossen und konserviert.

3.2.7. Digitale Bildanalyse der Färbeergebnisse

Zur digitalen Bearbeitung und Auswertung der histologischen Färbungen wurde die Software HALO® genutzt. Der Vorteil gegenüber dem konventionellen Vorgehen - bei dem ein Pathologe alle Merkmals-positiven Zellen selbst auszählen muss - ist die schnellere und quantitativ objektive Analyse. Zur einheitlichen Anwendung auf die 88 hier durchgeführten TMA, musste zunächst ein Analysealgorithmus erstellt werden. Hierzu wurde vorab eine TMA-Segmentierung mit der Software durchgeführt; d.h. es musste ein Raster erstellt werden, das für jede der 88 TMA-Stanzen eine definitive Position (i.e. *Core*) festlegte und somit die Zuordnung eines Schnittes und der zugehörigen Färbungen zu seiner jeweiligen Fallnummer erlaubte.

Um die Wahrscheinlichkeit für den wahren Wert zu erhöhen, wurde bei der späteren Auswertung ein arithmetisches Mittel aus der prozentualen Zellzahl zweier Gewebeschnitte eines Biopsats gebildet. Dazu wurde zu jedem TMA ein Spiegelblock erstellt, d.h. es wurden zwei TMAs angefertigt mit jeweils den gleichen Fällen in gleicher Anordnung, nur dass die Cores aus zwei unterschiedlichen Stellen des Tumors entnommen wurden. Von jedem TMA wurde anschließend ein Schnitt für jeden Antikörper und jeweils ein Schnitt für die HE-Färbung angefertigt und gefärbt, sodass letztlich 14 TMA-Schnitte gefärbt und mittels Software segmentiert, analysiert und ausgewertet wurden.

Zur Analyse nach erfolgter Segmentierung wurden zunächst drei einheitliche Classifier in Form verschiedener Farbabstufungen definiert, die letztlich eine Unterscheidung differenter Gewebeareale (z.B. positiv oder negativ in Bezug auf das Merkmal CD3) ermöglichten (vgl. Abbildung 4).



Abbildung 4: Classifier und Real-time-tuning.

CD3 nativ: mikroskopisches Nativbild. CD3 Classifier: *Classifier* Tumor: rot; *Classifier* Stroma: grün; *Classifier* Artefakt/ Objektträgerhintergrund: gelb. *Real-time-tuning*: Visualisierungsfunktion, die merkmalspositive und -negative Zellen anzeigt und eine Verifizierung erlaubt, ob das angelegte *Setting* Anzahl, Größe und zu untersuchendes Merkmal ausreichend gut erkennt (blau: merkmalspositiv, rot: merkmalsnegativ).

Sodann wurden die Analysealgorithmen durch das Anlegen sogenannter *Settings* erweitert. Hierzu wurde zunächst der Farbbereich für Merkmals-negative (i.e. Hämaun-positive Zellen) und -positive Zellen (DAB-positive Zellkerne) der immunhistochemischen Färbungen definiert. Die Programmfunktion *Setting* erlaubte es darüber hinaus, Feineinstellungen zu Zellgrenzen, Zellradius, Kernfärbung, optischer Dichte oder Zellkerngröße vorzunehmen.

Über die integrierte Visualisierungsfunktion *Realtime-tuning* innerhalb des Settings ließ sich die Einstellung überprüfen und justieren. Durch Abgleich mit der Nativ-Darstellung der Cores konnte ferner überprüft werden, ob positive oder negative Zellen in Bezug auf das zu untersuchende Merkmal (z.B. CD3) ausreichend erkannt wurden.

Mit Fertigstellung eines *Settings*, das auch den entsprechenden *Classifier* für eine Färbung berücksichtigte, war die Definition des Analysealgorithmus abgeschlossen. Der anhand einiger weniger *Cores* (in Abhängigkeit von der Färbung und Heterogenität des Tumors waren das in der Regel zwischen 5-8) erstellte Algorithmus konnte nun für die Analyse eines gesamten TMA und somit für alle 88 Positionen gestartet werden. Die absolute Zellzahl sowie der prozentuale Anteil an PD-L1 positiven Zellen wurde in jedem TMA-Core automatisch errechnet. Die Einstellung des Algorithmus war dabei so gewählt, dass die Zählung nur für PD-L1-positive Zellen innerhalb des Tumoreals erfolgte. Für die übrigen immunhistochemischen Färbungen wurden die absolute Zellzahl sowie der prozentuale Anteil Merkmals-positiver Lymphozyten für eine intratumorale und eine stromale Lokalisation errechnet.

3.2.8. Bestimmung von *Cut-off*-Levels

Jedes TMA wurde mittels o.g. Antikörperfärbung auf seinen PD-L1-Expressionsstatus hin untersucht. Der *tumor proportion score* (TPS) war definiert als der prozentuale Anteil an Tumorzellen mit kompletter oder partieller membranöser Anfärbbarkeit jeder Intensität [71, 72]. Für die sich anschließende Analyse des Expressionsstatus wurden *Cut-off*-Levels definiert, nach denen eine Unterteilung in drei Kategorien möglich war. Als PD-L1-negativ wurden dabei alle Färbeergebnisse definiert, die ein PD-L1-Expressionsniveau von bis zu einem 1% aufwiesen. Alle TMA, die mehr als 1% und weniger als 50% an PD-L1 positiven Tumorzellen aufwiesen, wurden definiert als Proben mit mäßigem PD-L1-Expressionsstatus. Für alle Gewebeproben mit einem prozentualen Anteil von mehr als 50% wurde ein hoher PD-L1-Status definiert.

Für die statistische Auswertung wurden zunächst die arithmetischen Mittel der für die jeweilige Färbung positiven Zellen für jeden einzelnen Core gebildet. Danach erfolgte eine Kategorisierung nach o.g. Prinzip. Abschließend wurde der PD-L1-Status den klinischen und histologischen Parametern gegenübergestellt.

3.2.9. Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mithilfe der Software SPSS Statistics vorgenommen. Stetige Variablen wurden durch Mittelwert +/- Standardabweichung beschrieben. Zudem wurden Boxplots erstellt und darüber hinaus eine einfaktorielle

Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, die einen Mittelwertvergleich zwischen den drei PD-L1-Kategorien erlaubte. Der Zusammenhang zwischen binären Merkmalen und dem PD-L1-Status wurde anhand von Kreuztabellen (grafisch dargestellt durch Balkendiagramme) untersucht, die mit dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet wurden. Zur besseren Darstellung, ob signifikante Unterschiede zwischen den Merkmalen bestehen, wurde außerdem Cramers V Maßzahl berechnet. Cramers V Maßzahl nimmt einen Wert zwischen 0 und 1 an. Liegt Cramers V sehr dicht an Eins besteht ein starker Zusammenhang zwischen den Variablen; liegt Cramers V dichter an Null besteht ein schwacher bzw. kein Zusammenhang.

Die statistische Auswertung der Überlebensdaten erfolgte durch Kaplan-Meier-Analysen. Subgruppen wurden hier durch den Log-Rank-Test miteinander verglichen. Die gesamte statistische Auswertung ist rein explorativ und erfolgt somit ohne eine multiple Testkorrektur, d.h. ohne Kontrolle der FWER (familywise error rate). Ein p -Wert kleiner/ gleich 0,05 in einem Test wird daher nur als statistisch relevant, nicht jedoch als signifikant bezeichnet.

Boxplots und Varianzanalyse

Für die graphische Darstellung der stetigen Merkmale wurden Boxplots gewählt; einer für jede PD-L1-Kategorie. Die Boxplots sind wie folgt zu werten: Innerhalb der Box befinden sich 50% der berechneten Werte für die jeweilige Kategorie. Die Box wird durch das erste (25% der Werte sind kleiner) und dritte Quartil (75% der Werte sind kleiner) begrenzt. Der Interquartilsabstand wird durch die Länge der Box beschrieben und stellt ein Maß für die Streuung dar. Das zweite Quartil kennzeichnet jeweils den Median. Die Minimum- und Maximumwerte sind die Limitationen der Whisker, welche Werte kennzeichnen, die außerhalb der Box liegen. Die Länge des Whiskers ist dabei jedoch maximal auf das 1,5-fache des Interquartilabstandes begrenzt. Werte außerhalb dieses Bereichs werden als Ausreißer bezeichnet. Der Vergleich von Median und Mittelwert erlaubt Aussagen über die Streuung der erhobenen Werte und lässt Rückschlüsse zu einer Normalverteilung zu. Die vorliegenden Ergebnisse beziehen sich auf einen Stichprobenumfang von kleiner 100, sodass die Formulierung "Normalverteilung" nur deskriptiver Natur sein kann. Das Niveau der Konfidenzintervalle der Mittelwerte wurde für alle Berechnungen bei 95% festgesetzt. Für alle stetigen Variablen wurde darüber hinaus eine einfaktorielle Varianzanalyse

durchgeführt, die einen Mittelwertvergleich zwischen den drei Kategorien *negativ*, *mäßig* und *hoch* erlaubte und mithilfe derer getestet wurde, ob sich ein signifikanter Unterschied für die stetige abhängige Variable zwischen den drei PD-L1-Expressionsgruppen ergab.

4. Ergebnisse

4.1. Gesamtkollektiv

Das über die Datenbank ermittelte Kollektiv aus Patienten mit einem PECA von Kopf oder Hals umfasste zunächst 174 Patienten. Nach mikroskopischer Sichtung und Prüfung der vorhandenen Gewebeproben für die Eignung zur Herstellung eines TMA verblieben insgesamt 88. Von diesen 88 Fällen konnten für insgesamt vier Patienten keine klinischen Parameter aus der Datenbank erhoben werden. Die definitive Probenanzahl, aus denen das TMA angefertigt wurde, betrug somit 84. Von den 84 Patientenproben konnte für insgesamt 79 ein PD-L1-Expressionsstatus erhoben werden. Fünf der 84 Fälle schieden aufgrund von Problemen bei der Schnittanfertigung am Mikrotom oder im Rahmen des Färbeprozesses aus. Zudem war es nicht möglich, für alle histologischen und klinischen Parameter einen kompletten Datensatz zu erheben. Eine statistische Analyse konnte nur für die Fälle vorgenommen werden, in denen das jeweils zu betrachtende Merkmal bzw. die entsprechende Variable zuvor erfasst worden war. Die Fallzahl schwankt aus diesem Grund für die jeweiligen Analysen zwischen 38 und 79 inkludierten Fällen. Tabelle 7 ist zu entnehmen, wie viele Fälle letztlich pro Analyse ausgewertet wurden.

Tabelle 7: Fallzahlen pro Analyse

Merkmal	Fallzahl (n)	Merkmal	Fallzahl (n)
PD-1-Positivität	77	Tumorart	79
CD3- Positivität	75	Tumorstatus	74
CD4- Positivität	76	Lymphknotenbefall	68
CD8- Positivität	75	Fernmetastasierung	50
CD56- Positivität	76	Grading	74
CD68- Positivität	79	Therapieform	74
Alter	79	R-Status	79
Geschlecht	79	Tumorfreiheit	48
Alkoholkonsum	48	Gesamtüberleben	79
Rauchen	59	Rezidivfreie Zeit	38
Tumorlokalisation	79		

4.2. Qualitative Analyse der Färbeergebnisse

Wie für immunhistochemische Färbungen charakteristisch, zeigte sich an den erwarteten Lokalisationen des Zielantigens, d.h. entweder im Zytoplasma oder in der Zellmembran der untersuchten Gewebe, eine kontrastreiche Braunfärbung. Die durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung kontrastierten Zellkerne präsentierten sich erwartungsgemäß blau. Die positiv mitgeführte Kontrollprobe wies ebenfalls eine erwartungsgemäß deutliche Braunfärbung auf. Für die mitgeführte Negativkontrolle ergab sich für die immunhistochemischen Färbungen keine Anfärbbarkeit. Die jeweiligen Anfärbungen konnten somit als spezifisch für die entsprechenden Zielantigene gewertet werden.

Abbildung 5a zeigt beispielhaft histologische Gewebeschnitte je einer immunhistochemischen Färbung mit PD-L1-negativem, -mäßigem und hohem Expressionsstatus. Ferner findet sich in

Abbildung 5b je ein Beispiel der immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von CD-3, -4, -8, -56 und -68 sowie für den verwendeten Antikörper gegen PD-1.

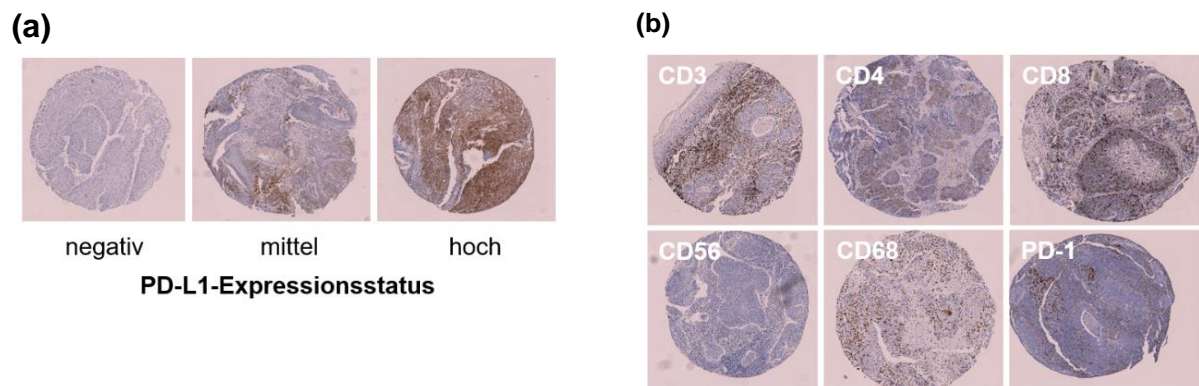


Abbildung 5: Beispielhafte immunhistochemische Färbungen zur Visualisierung der Zielantigene. (a) PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (b) Positivität der Gewebeschnitte in Bezug auf CD3, CD4, CD8, CD56, CD68 und PD-1.

Assoziationen mit PD-L1

Zur Untersuchung des Einflusses des PD-L1-Expressionsstatus auf das Entzündungsinfiltrat wurde die Positivität der Gewebeproben von CD3, CD4, CD8, CD56 und CD68 sowie die Positivität des PD-1-Rezeptors untersucht. Jede einzelne dieser Komponenten wurde dem PD-L1-Expressionsstatus gegenübergestellt.

4.2.1. Assoziation von PD-L1 und PD-1-Positivität

Um die Immunantwort von PD-1-positiven Lymphozyten zu untersuchen, konnte für insgesamt 77 Gewebeproben der prozentuale Anteil PD-1-positiver Zellen erhoben und dem PD-L1-Expressionsstatus der Tumorzellen gegenübergestellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Von den insgesamt 77 Gewebeproben zeigten vier keine PD-L1-Expression, 62 einen mäßigen, 11 einen hohen PD-L1-Expressionsstatus. Die Abbildung demonstriert, dass mit steigendem PD-L1-Expressionsniveau auch der prozentuale Anteil an PD-1-positiven Zellen innerhalb der Gewebeprobe zunimmt. Der Interquartilenabstand des Boxplots der Gruppe mit mäßiger PD-L1-Expression zeigt auf, dass die Werte relativ dicht beieinander liegen, wobei vier Werte nicht von der Box erfasst wurden, darunter findet sich ein als „extrem“ eingestufte Wert bei ca. 34%. Für die Gruppe mit hohem PD-L1-Expressionsstatus verteilte sich die PD-1-Positivität etwas breiter; es wurden jedoch alle Werte vom Boxplot erfasst. In der Kategorie mit mäßiger PD-L1-Expression wies die Hälfte der untersuchten Gewebeproben einen prozentualen Anteil an PD-1-positiven Zellen zwischen 3% und knapp 7% auf. In der Kategorie mit hohem PD-L1-Expressionsstatus lag die Hälfte der Werte zwischen 2% und 9%.

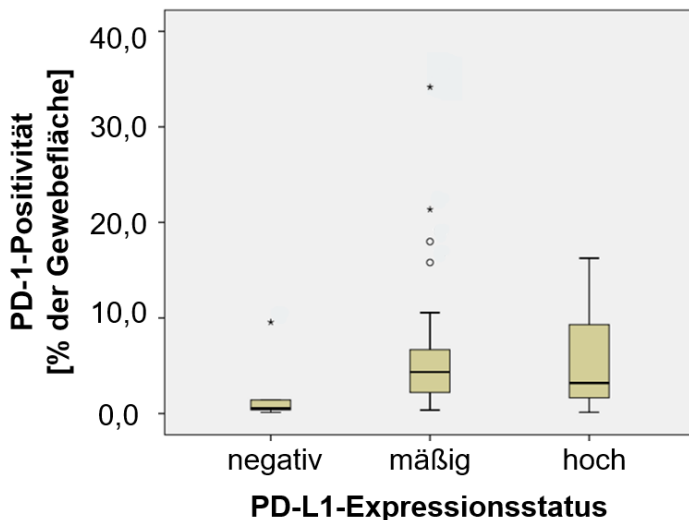


Abbildung 6: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und PD-1-Positivität der Gewebeproben.

Quantifizierung der PD1-Positivität [% der Gewebefläche] in Bezug auf den PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=77; °: Wert > 1,5fache Standardabweichung; *: Wert > 3fache Standardabweichung)

Das 95%-Konfidenzintervall der Mittelwerte (s. Appendix) ist für jede Kategorie relativ eng und schließt den jeweiligen Mittelwert ein. Mit Ausnahme der Gruppe mit negativem PD-L1-Expressionsstatus zeigt sich ferner eine relativ gleichbleibende Standardabweichung (5-6%). Zur Signifikanztestung hinsichtlich bestehender Unterschiede zwischen den PD-L1-Expressions-Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Abbildung 7 demonstriert - wie auch schon die Boxplots - die Tendenz, dass mit steigendem PD-L1-Expressionsniveau auch der prozentuale Anteil an PD-1-positiven Zellen innerhalb der Gewebeproben zunimmt, wenngleich diese Daten als statistisch nicht signifikant zu werten sind ($p: 0,24$) und sich kein linearer Zusammenhang zeigt.

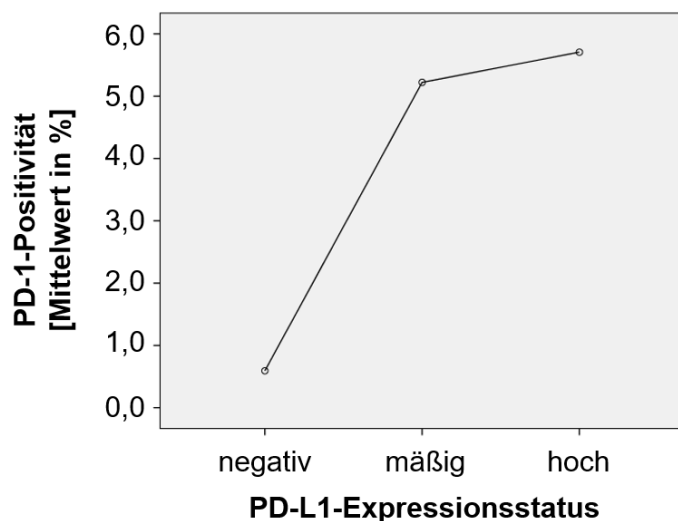


Abbildung 7: Assoziation der Mittelwertunterschiede [%] von PD-1-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=77; p : 0,24)

4.2.2. Assoziation von PD-L1 und CD3-Positivität

CD3 ist maßgeblich an der Aktivierung von T-Lymphozyten beteiligt, sodass dessen Vorkommen in antitumoralen Entzündungsinfiltraten anzunehmen ist. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob sich der Anteil CD3-positiver Zellen in Abhängigkeit der Expression von PD-L1 verändert.

Das Kollektiv, das zu diesem Zweck untersucht werden konnte, umfasste 75 Fälle, von denen vier PD-L1 nicht exprimierten, 61 einen mäßigen und zehn einen hohen PD-L1-Expressionsstatus aufwiesen.

Wie Abbildung 8 zu entnehmen ist, erhöht sich mit steigendem PD-L1-Expressionsniveau auch der prozentuale Anteil an CD3-positiven Zellen innerhalb der Gewebeproben. Die Boxplots weisen - bis auf den für PD-L1 „negativ“ - einen relativ breiten Interquartilsabstand auf, was bedeutet, dass sich die Werte für CD3-Positivität relativ stark verteilen. Für die Kategorie PD-L1 „mäßig“ wies die Hälfte der untersuchten Gewebeproben immerhin einen prozentualen Anteil an CD3-positiven Zellen zwischen knapp 20% und 42% auf. In der Kategorie PD-L1 „hoch“ lag die Hälfte der Werte sogar zwischen 20,5% und 59,5%. Alle Werte wurden ferner durch die Boxplots erfasst; Extremwerte ergaben sich nicht. Das Konfidenzintervall der Mittelwerte für PD-L1 „negativ“ ist relativ schmal (s. Appendix); das von PD-L1 „mäßig“ und PD-L1 „hoch“ relativ breit. Das bedeutet, dass die prozentualen Anteile von CD3-Positivität hier stärker variieren.

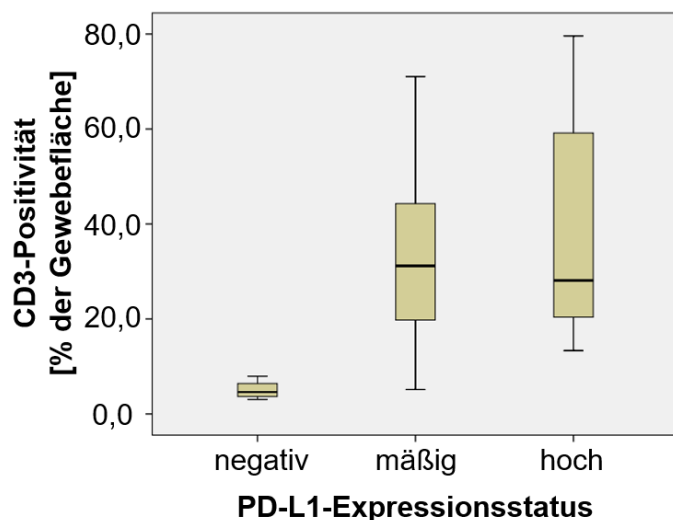


Abbildung 8: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und CD3-Positivität der Gewebeproben.

Quantifizierung der CD3-Positivität [% der Gewebefläche] in Bezug auf den PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=75)

Abbildung 9 zur Assoziation der Mittelwertunterschiede von PD-L1-Expressionsstatus und CD3-Positivität der Gewebeproben untermauert die Beobachtung, dass mit steigendem PD-L1-Expressionsstatus auch der prozentuale Anteil von CD3-positiven Zellen zunimmt. Das Ergebnis ist als statistisch relevant zu werten ($p: 0,01$).

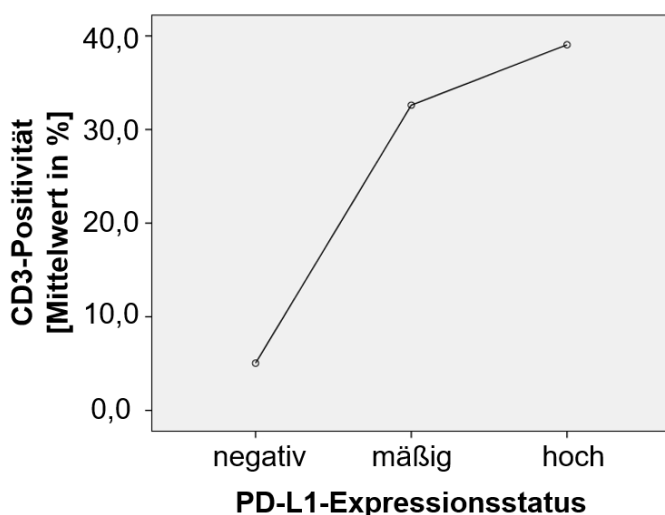


Abbildung 9: Assoziation der Mittelwertunterschiede [%] von CD3-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=75; $p: 0,01$)

4.2.3. Assoziation von PD-L1 und CD4-Positivität

In aller Regel enthalten Entzündungsinfiltrate CD4-positive Zellen, da diese von T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen charakteristischerweise exprimiert werden. Zur Assoziation eines möglichen Einflusses des PD-L1-Expressionsstatus mit dem Vorhandensein CD4-positiver Zellen wurden beide Parameter einander gegenübergestellt.

Abbildung 10 macht deutlich, dass insgesamt 76 Gewebeproben bzgl. dieser Merkmale untersucht werden konnten. Vier der 76 Fälle wiesen einen negativen, 62 einen mäßigen und zehn einen hohen PD-L1-Expressionsstatus auf. Wie die Abbildung im Anhang zeigt, liegt das 95%-Konfidenzintervall der Mittelwerte für die Gewebeproben mit negativem PD-L1-Expressionsniveau bei Werten zwischen 0% und 13,1%.; für die Kategorie PD-L1 „mäßig“ bei Werten zwischen 6,1% und 11,9% und für die Kategorie PD-L1 „hoch“ bei Werten zwischen 2,8% und 14,6%. Die obere Grenze für das Konfidenzintervall der Mittelwerte ist somit für alle drei Kategorien relativ ähnlich, die untere Grenze zeigt hingegen stärkere Schwankungen. Ferner wurden bei der Kategorie PD-L1 „mäßig“ neun Werte nicht vom Boxplot erfasst.

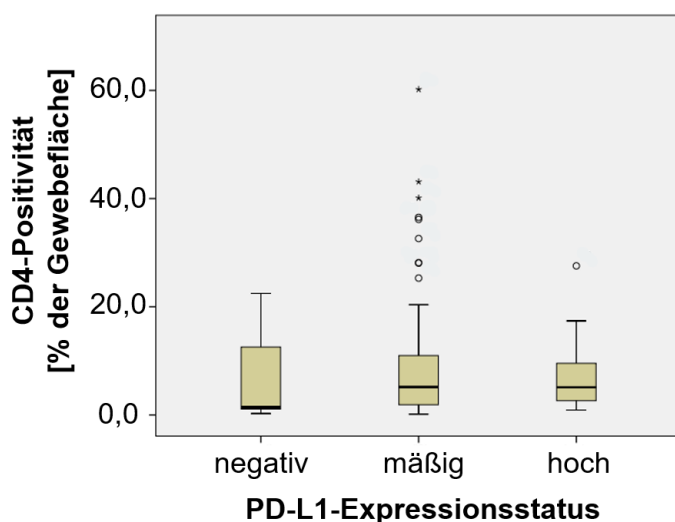


Abbildung 10: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und CD4-Positivität der Gewebeproben.

Quantifizierung der CD4-Positivität [% der Gewebefläche] in Bezug auf den PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=76; °: Wert > 1,5fache Standardabweichung; *: Wert > 3fache Standardabweichung)

Die einfaktorielle Varianzanalyse (vgl. Abbildung 11) zum Vergleich der Mittelwerte lässt keinen definitiven Trend dahingehend erkennen, ob das PD-L1-

Expressionsniveau mit dem Vorhandensein CD4-positiver Zellen korreliert, da die Kurve zur Darstellung der Mittelwertunterschiede für die Gruppen PD-L1 „negativ“ und PD-L1 „mäßig“ ansteigt, für PD-L1 „hoch“ jedoch wieder abfällt, wenngleich der prozentuale Anteil von CD4-positiven Zellen verglichen mit PD-L1 „negativ“ höher ist. Die Werte sind als statistisch nicht signifikant zu werten ($p: 0,66$).

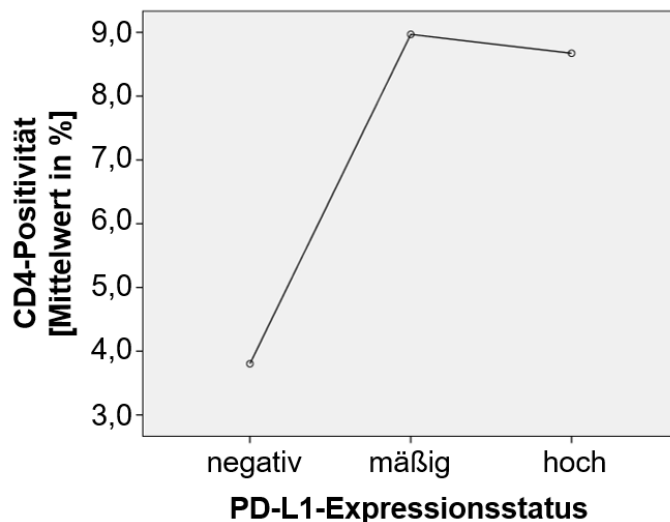


Abbildung 11: Assoziation der Mittelwertunterschiede [%] von CD4-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=76; $p: 0,66$)

4.2.4. Assoziation von PD-L1 und CD8-Positivität

CD8-positive, zytotoxische T-Zellen sind im Rahmen vieler inflammatorischer Prozesse aktiv, weshalb ihr Vorkommen in Assoziation zum PD-L1-Expressionsstatus untersucht werden sollte. Das Kollektiv für diese Betrachtung umfasste 75 Gewebeproben, von denen vier einen „negativen“, 61 einen „mäßigen“ und zehn einen „hohen“ PD-L1-Expressionsstatus aufwiesen.

Der kleinste Datenwert für CD8-Positivität in der Gruppe PD-L1 „negativ“ lag bei 1,0%, der größte bei 18,5%. In der Gruppe PD-L1 „mäßig“ lag der kleinste Wert bei 2,0%, der größte bei 63,8% und für PD-L1 „hoch“ lagen diese Werte bei 12,7% bzw. 58,4%. Für die Kategorie PD-L1 „mäßig“ wies die Hälfte der Gewebeproben einen prozentualen Anteil CD8-positiver Zellen am Entzündungsinfiltrat von schätzungsweise 7-30% auf und für PD-L1 „hoch“ eine Schwankungsbreite von ungefähr 17-30%. Das 95%-Konfidenzintervall der Mittelwerte ist klein, die ermittelten Werte liegen relativ dicht beieinander.

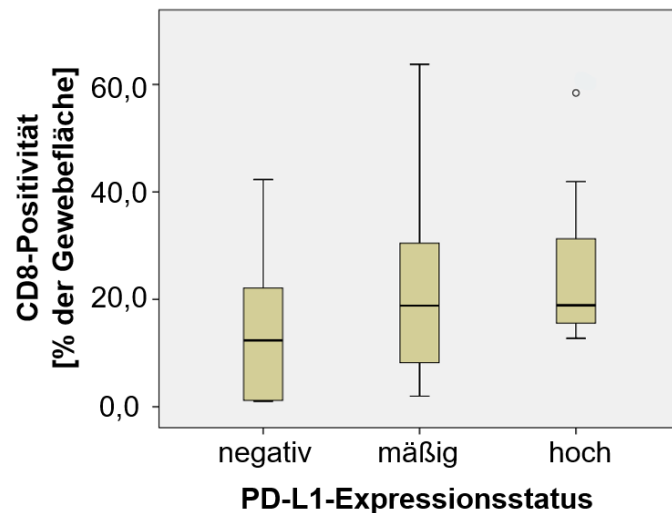


Abbildung 12: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und CD8-Positivität der Gewebeproben.

Quantifizierung der CD8-Positivität [% der Gewebefläche] in Bezug auf den PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=75; °: Wert > 1,5facher Standardabweichung.)

Durch Mittelwertvergleich mittels einfaktorieller Varianzanalyse (vgl. Abbildung 13) lässt sich die Tendenz erkennen, dass PD-L1-Expressionniveau und CD8-Positivität korrelieren; eine statistische Relevanz ergab sich in diesem Zusammenhang jedoch nicht ($p: 0,10$).

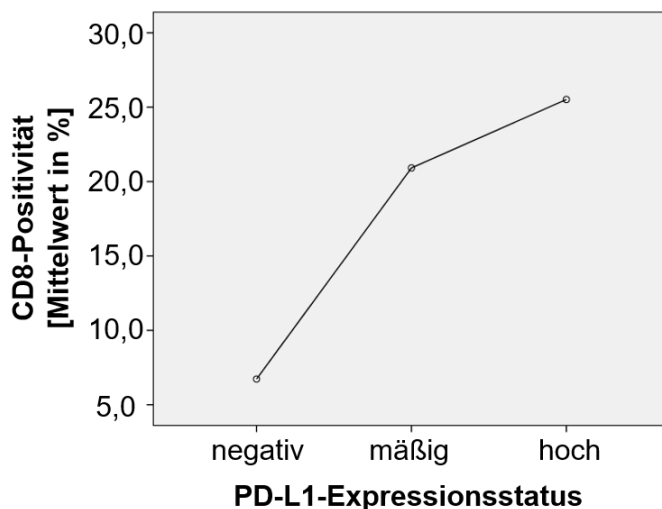


Abbildung 13: Assoziation der Mittelwertunterschiede [%] von CD8-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=75; $p: 0,10$)

4.2.5. Assoziation von PD-L1 und CD56-Positivität

Wie bereits erwähnt, sind natürliche Killerzellen und eine Untergruppe aktivierter T-Zellen in der Lage, CD56 zu exprimieren und an diversen Inflammationsprozessen beteiligt. Aus diesem Grund sollte beurteilt werden, ob CD56-exprimierende Zellen ebenfalls im tumorbegleitenden Entzündungsinfiltrat von PECA vorkommen und sich der prozentuale Anteil in Abhängigkeit vom PD-L1-Expressionsniveau verändert.

Im Hinblick auf diese beiden Parameter konnte ein Kollektiv von 76 Fällen analysiert werden. Vier Gewebeproben exprimierten dabei PD-L1 nicht, 63 mäßig und neun in hohem Ausmaß. Das entsprechende Konfidenzintervall der Mittelwerte zeigt für alle drei Gruppen eine geringe Breite. Abbildung 14 demonstriert, dass CD56-Positivität in allen PD-L1-Kategorien einen relativ geringen prozentualen Anteil am Entzündungsinfiltrat ausmacht. Die untere Whiskergrenze für PD-L1 „negativ“ lag bei etwa 0,6%, die obere bei 7,0%. In der Gruppe PD-L1 „mäßig“ lag die untere Grenze bei 0,0% und die obere Grenze bei 65,8%. Für PD-L1 „hoch“ lag das Boxplot-Minimum bei 0,0% und das Maximum bei 2,8%. In der Gruppe PD-L1 „mäßig“ zeigte sich ein extremer Ausreißer bei 65,8%, was zu einer starken Asymmetrie des Boxplots führt. Der Median beträgt für die Kategorien PD-L1 „mäßig“ und PD-L1 „hoch“ etwa 1% und befindet sich damit relativ dicht am jeweiligen Mittelwert.

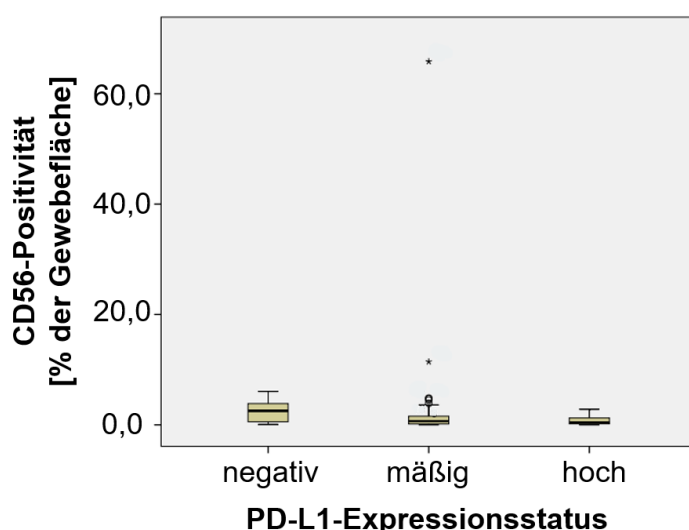


Abbildung 14: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und CD56-Positivität der Gewebeproben.

Quantifizierung der CD56-Positivität [% der Gewebefläche] in Bezug auf den PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=76; °: Wert > 1,5facher Standardabweichung; *: Wert > 3facher Standardabweichung)

Aus dem Mittelwertvergleich lässt sich entnehmen, dass mit steigender PD-L1-Expression der prozentuale Anteil an CD56-positiven Zellen im tumorbegleitenden Entzündungsinfiltrat abnimmt. Diese Tendenz ist Abbildung 15 zu entnehmen, jedoch als statistisch nicht relevant zu werten ($p: 0,82$).

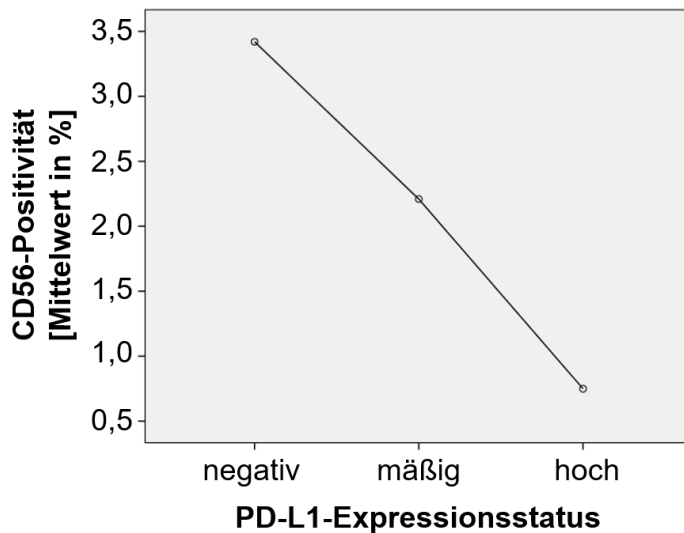


Abbildung 15: Assoziation der Mittelwertunterschiede [%] von CD56-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=76; $p: 0,82$)

4.2.6. Assoziation von PD-L1 und CD68-Positivität

CD68 wird u.a. von Monozyten, Makrophagen und Mastzellen exprimiert, für die ein Vorkommen in Entzündungsinfiltraten und insbesondere auch im inflammatorischen Mikromilieu von Tumoren bekannt ist. Es sollte daher untersucht werden, ob die CD68-Positivität in Abhängigkeit vom PD-L1-Expressionsstatus variiert. Diesbezüglich ergab sich für die Untergrenze des Boxplots in Kategorie PD-L1 „negativ“ eine Spannweite von 7,1% bis 14,6%, für PD-L1 „mäßig“ Werte zwischen 2,7% und 49,9%. Für PD-L1 „hoch“ war der Boxplot zwischen 5,0% und 57,3% definiert. Wie Abbildung 16 zu entnehmen ist, liegen alle berechneten Werte für den prozentualen Anteil an CD68-positiven Zellen innerhalb der Quartile. Diese zeigen - bis auf die des Boxplots von PD-L1 „negativ“ - jedoch eine relativ große Spannweite. Der Grafik ist ferner zu entnehmen, dass 50% der Gewebeproben bei PD-L1-mäßig einen prozentualen Anteil mit Werten zwischen 11%-31% an CD68-exprimierenden Zellen aufwies und dieser Anteil unter den Gewebeproben mit hohem PD-L1-Status sogar noch höher lag (schätzungsweise zwischen 17-40%). Die Konfidenzintervalle der Mittelwerte sind

relativ klein, sodass anzunehmen ist, dass 95% der erhobenen CD68-Prozentwerte relativ dicht beieinander liegen.

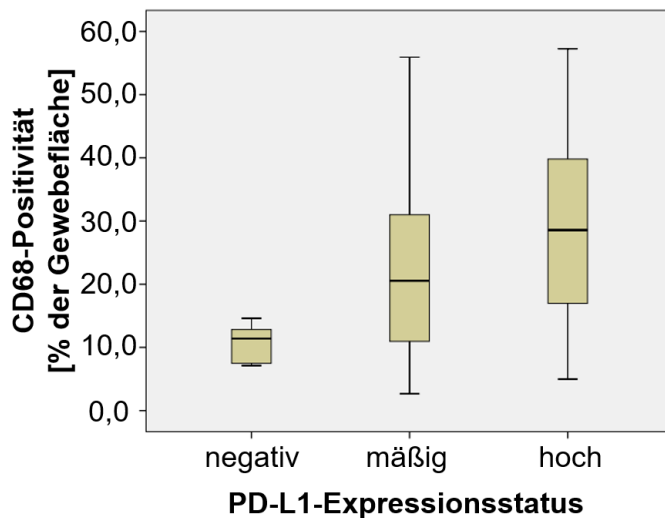


Abbildung 16: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und CD68-Positivität der Gewebeproben.

Quantifizierung der CD68-Positivität [% der Gewebefläche] in Bezug auf den PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=79)

Aus Abbildung 17 ist zu ersehen, dass mit zunehmender Expression an PD-L1 auch der prozentuale Anteil CD68-positiver Zellen linear und relevant steigt ($p: 0,02$).

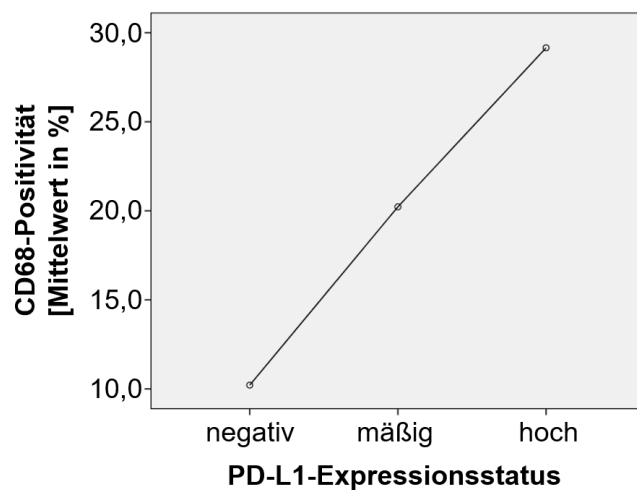


Abbildung 17: Assoziation der Mittelwertunterschiede [%] von CD68-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch). (n=79; $p: 0,02$)

4.3. Assoziation von PD-L1 und klinischen Parametern

Der erhobene PD-L1-Expressionsstatus für jede Gewebeprobe wurde nicht nur histologischen, sondern auch klinischen Parametern gegenübergestellt.

4.3.1. Assoziation von PD-L1 und Alter

Für die Untersuchung eines möglichen Einflusses des Alters auf das PD-L1-Expressionsniveau konnten 79 Gewebeproben ausgewertet werden. Das Durchschnittsalter zum Diagnosezeitpunkt der Patienten betrug 62,2 Jahre. Der jüngste Patient, der in die Stichprobe eingeschlossen wurde, war zum Diagnosezeitpunkt 35 Jahre, der älteste 86 Jahre alt. Von den 79 untersuchten Gewebeproben wies der Großteil (n=64) einen mäßigen PD-L1-Expressionsstatus auf. Von den restlichen 15 Patienten ergab sich für vier Gewebeproben ein negativer und für 11 ein hoher PD-L1-Expressionsstatus. Sowohl der jüngste als auch der älteste Patient waren in die Kategorie PD-L1-Expressionsstatus „mäßig“ inkludiert.

Um herauszufinden, ob sich die Mittelwerte für das Alter zum Diagnosezeitpunkt zwischen den drei Gruppen unterscheiden, wurde wiederum eine Varianzanalyse durchgeführt. Abbildung 18 zeigt, dass Patienten mit einem hohen PD-L1-Status tendenziell jünger waren, wobei die Ergebnisse jedoch als statistisch nicht relevant zu werten sind ($p: 0,75$).

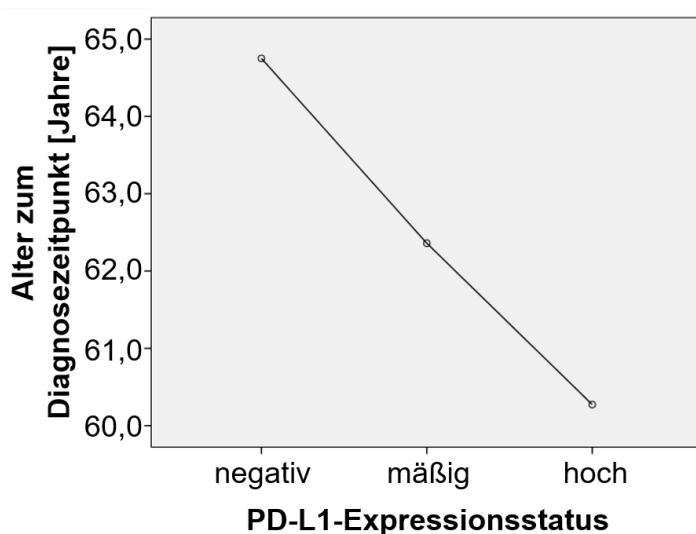


Abbildung 18: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Alter zum Diagnosezeitpunkt [Jahre]. (n=79; $p: 0,75$)

4.3.2. Assoziation von PD-L1 und Geschlecht

Vom Gesamtkollektiv konnten 79 Fälle im Hinblick auf eine Assoziation von Geschlecht und PD-L1-Expressionsniveau analysiert werden (vgl. Abbildung 19). Der überwiegende Anteil der Patienten mit einem PECA im Kopf-Hals-Bereich waren Männer (n=59). Davon wiesen 6,8% einen negativen, 79,8% einen mäßigen und 10,1% einen hohen PD-L1-Expressionsstatus auf. Von insgesamt 20 Frauen in der Stichprobe hatten 85,0% ein mäßig ausgeprägtes und 15,0% ein hohes PD-L1-Expressionsniveau. Cramers V Maßzahl liegt bei 0,13; ein relevanter Zusammenhang zwischen Geschlecht und PD-L1 besteht demnach nicht.

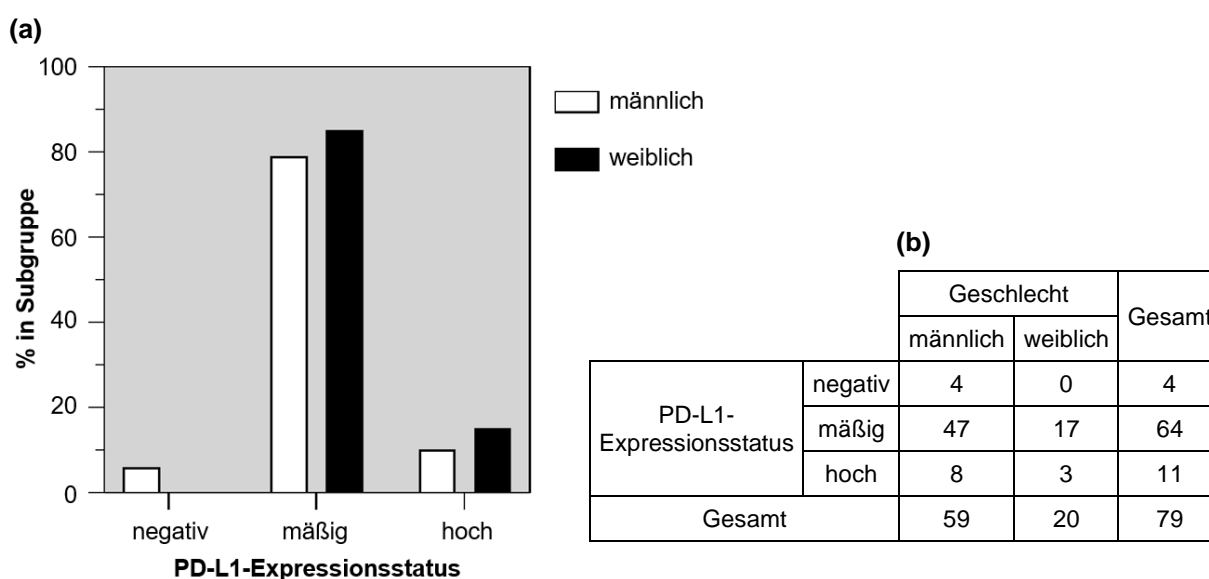


Abbildung 19: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Geschlecht.

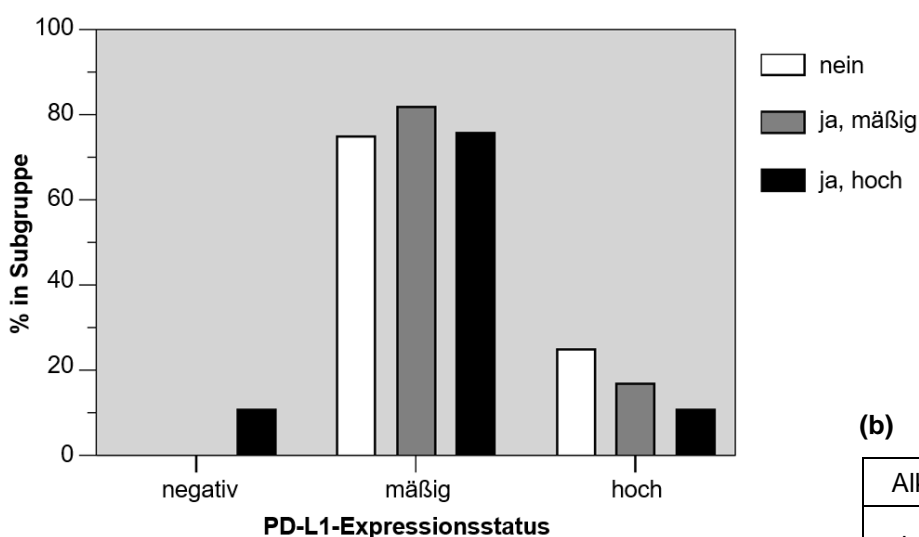
(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit dem Geschlecht (männlich, weiblich). (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit dem Geschlecht (männlich, weiblich). (n=79)

4.3.3. Assoziation von PD-L1 und Alkoholkonsum

Alkoholkonsum gilt als einer der Hauptrisikofaktoren für die Pathogenese von PECA. Aus diesem Grund wurde anhand der zur Verfügung stehenden Daten der Alkoholkonsum dem PD-L1-Expressionsstatus gegenübergestellt. Für 31 Patienten lagen keine Daten zum Alkoholkonsum vor; für die übrigen 48 Patienten konnte eine Einteilung des Alkoholkonsums in „nein“, „ja, mäßig“ bzw. „ja, hoch“ vorgenommen werden. Unter den insgesamt 8 Patienten mit fehlendem Alkoholkonsum hatte

niemand einen negativen PD-L1-Expressionsstatus. Für 75,0% der Patienten in dieser Kategorie zeigte sich ein mäßiges, für 15% ein hohes PD-L1-Expressionsniveau. Von den insgesamt 23 Patienten, die mäßig Alkohol konsumierten, hatte keiner einen negativen, 82,6% einen mäßigen und die übrigen 17,4% einen hohen PD-L1-Expressionsstatus. Unter den 17 Patienten mit hohem Alkoholkonsum ließ sich für 11,8% ein negativer bzw. hoher PD-L1-Expressionsstatus nachweisen. Die überwiegende Mehrheit der Patienten in dieser Kategorie (76,5%) wies ein mäßiges PD-L1-Expressionslevel auf. Cramers V Maßzahl beträgt 0,17; ein relevanter Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und PD-L1 besteht nicht.

(a)



(b)

		Alkoholkonsum			Gesamt
		nein	ja, mäßig	ja, hoch	
PD-L1-Expressionsstatus	negativ	0	0	2	2
	mäßig	6	19	13	38
	hoch	2	4	2	8
Gesamt		8	23	17	48

Abbildung 20: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Alkoholkonsum.

(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum (nein; ja, mäßig; ja, hoch). (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum (nein; ja, mäßig; ja, hoch). (n=48)

4.3.4. Assoziation von PD-L1 und Tabakkonsum

Wie aus der Literatur bekannt, ist Rauchen ein wesentlicher Faktor für die Entstehung von PECA im Kopf-Hals-Bereich. Für 59 von insgesamt 79 Patienten konnte anhand der Datenlage eine Aussage zum Tabakkonsum erhoben werden.

Abbildung 21 demonstriert, dass von diesen 59 Patienten 84,7% einen regelmäßigen Nikotinkonsum angaben; lediglich 15,3% waren Nichtraucher.

Nur 3,4% aller eingeschlossenen Patienten wiesen ein negatives PD-L1-Expressionsniveau auf, hiervon waren alle Raucher. 81,4% aller eingeschlossenen Gewebeproben zeigten einen mäßigen PD-L1-Expressionsstatus, wovon anteilig 71,2% der Gruppe „Raucher“ und nur 10,2% der Gruppe „Nichtraucher“ zugeordnet werden konnten. In Analogie hierzu konnte in 15,3% der untersuchten und hier eingeschlossenen Fälle ein hoher PD-L1-Expressionsstatus in den entsprechenden Gewebeproben nachgewiesen werden, wovon anteilig 10,2% auf Raucher und 5,1% auf Nichtraucher entfielen. Cramers V Maßzahl beträgt 0,22. Rauchen beeinflusst die PD-L1-Expression demnach nicht.

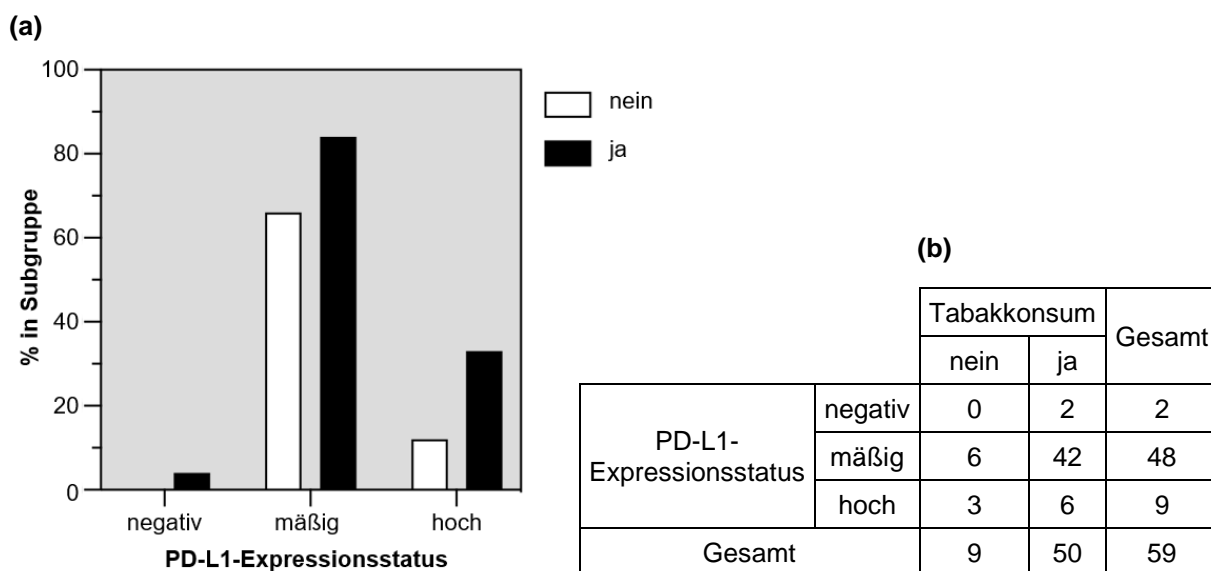


Abbildung 21: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Tabakkonsum.

(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit dem Tabakkonsum (nein, ja). (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit dem Tabakkonsum (nein, ja). (n=59)

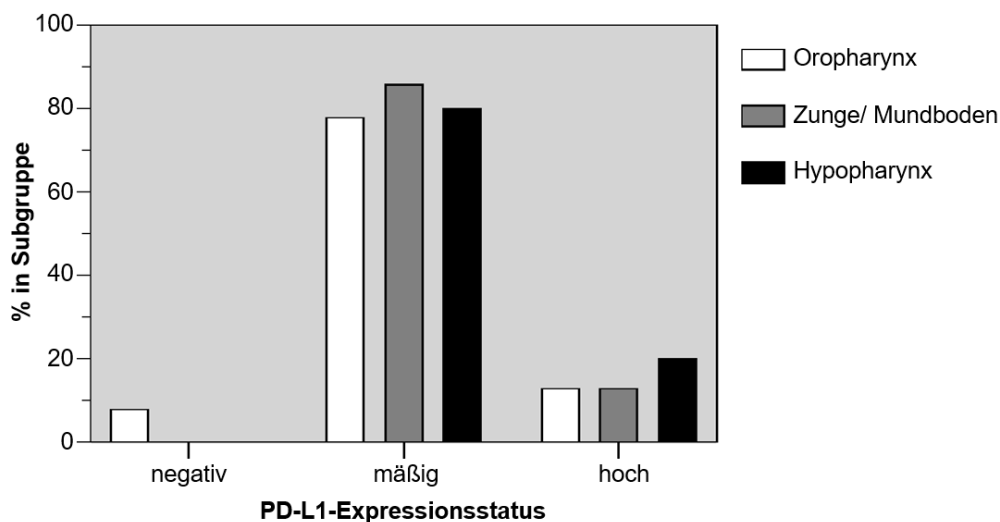
4.3.5. Assoziation von PD-L1 und Tumorlokalisierung

Zur Diskriminierung etwaiger Unterschiede des PD-L1-Expressionsstatus in Abhängigkeit der Tumorlokalisierung wurden diese beiden Parameter gegenübergestellt.

Abbildung 22 ist zu entnehmen, dass von insgesamt 79 Gewebeproben über die Hälfte (58,2%) aus dem Bereich des Oropharynx stammten. Knapp 30% des untersuchten

Tumorgewebes stammte von der Zunge oder dem Mundboden. Lediglich 12,7% der Patienten hatten einen Tumor im Bereich des Hypopharynx. 5,1% aller Gewebeproben zeigten keine PD-L1-Expression, wovon alle Exzidate aus dem Oropharynx stammten. 45,6% der Exzidate mit mäßiger PD-L1-Expression konnten Proben aus dem Oropharynx zugeordnet werden, 25,3% entfielen auf Zunge bzw. Mundboden und 10,1% entsprachen Biopsaten aus dem Hypopharynx. Dies entspricht zusammengenommen 81,0% aller ausgewerteten Proben. 13,9% aller untersuchten Gewebe wiesen einen hohen PD-L1-Expressionsstatus auf; 7,6% entfielen auf Exzidate aus dem Oropharynx, 3,8% auf Zunge bzw. Mundboden und 2,5% auf Proben aus dem Hypopharynx. Cramers V Maßzahl beträgt 0,12. Ein relevanter Zusammenhang zwischen Tumorlokalisierung und PD-L1 besteht nicht.

(a)



(b)

		Tumorlokalisierung			Gesamt
		Oropharynx	Zunge/ Mundboden	Hypopharynx	
PD-L1- Expressionsstatus	negativ	4	0	0	4
	mäßig	36	20	8	64
	hoch	6	3	2	11
Gesamt		46	23	10	79

Abbildung 22: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Tumorlokalisierung.

(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit der Tumorlokalisierung (Oropharynx, Zunge/ Mundboden, Hypopharynx). (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit der Tumorlokalisierung (Oropharynx, Zunge/ Mundboden, Hypopharynx). (n=79)

4.3.6. Assoziation von PD-L1 und Tumorart

Viele Tumoren besitzen die Fähigkeit, sich an das Immunsystem zu adaptieren. Die Art des Tumors kann für die Entwicklung von Resistenzmechanismen eine wichtige Rolle spielen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, in welcher Ausprägung und mit welcher Häufigkeit die verschiedenen PECA-Varianten PD-L1 exprimieren. Unterschieden wurde zwischen Primarius, Zweitumor, Lymphknotenmetastase und dem Auftreten eines Lokalrezidivs.

Abbildung 23 zeigt auf, dass sich unter 79 ausgewerteten Fällen 58 Primarien, 14 Zweitumoren, drei Lymphknotenmetastasen und vier regionäre Rezidive befanden. Von den 58 Primärtumoren zeigten 6,9% einen negativen, 77,6% einen mäßigen und 15,5% einen hohen PD-L1-Expressionsstatus. Von den 14 Zweitumoren exprimierten 92,9% PD-L1 in mäßigem und 7,1% in hohem Ausmaß. In der Kategorie der Lymphknotenmetastasen exprimierten 66,7% PD-L1 in mäßiger und 33,3% in hoher Ausprägung. Von den untersuchten Lokalrezidiven zeigten 100% eine mäßige PD-L1-Expression. Cramers V Maßzahl beträgt 0,11. Ein relevanter Zusammenhang zwischen Tumorart und PD-L1 besteht demnach nicht.

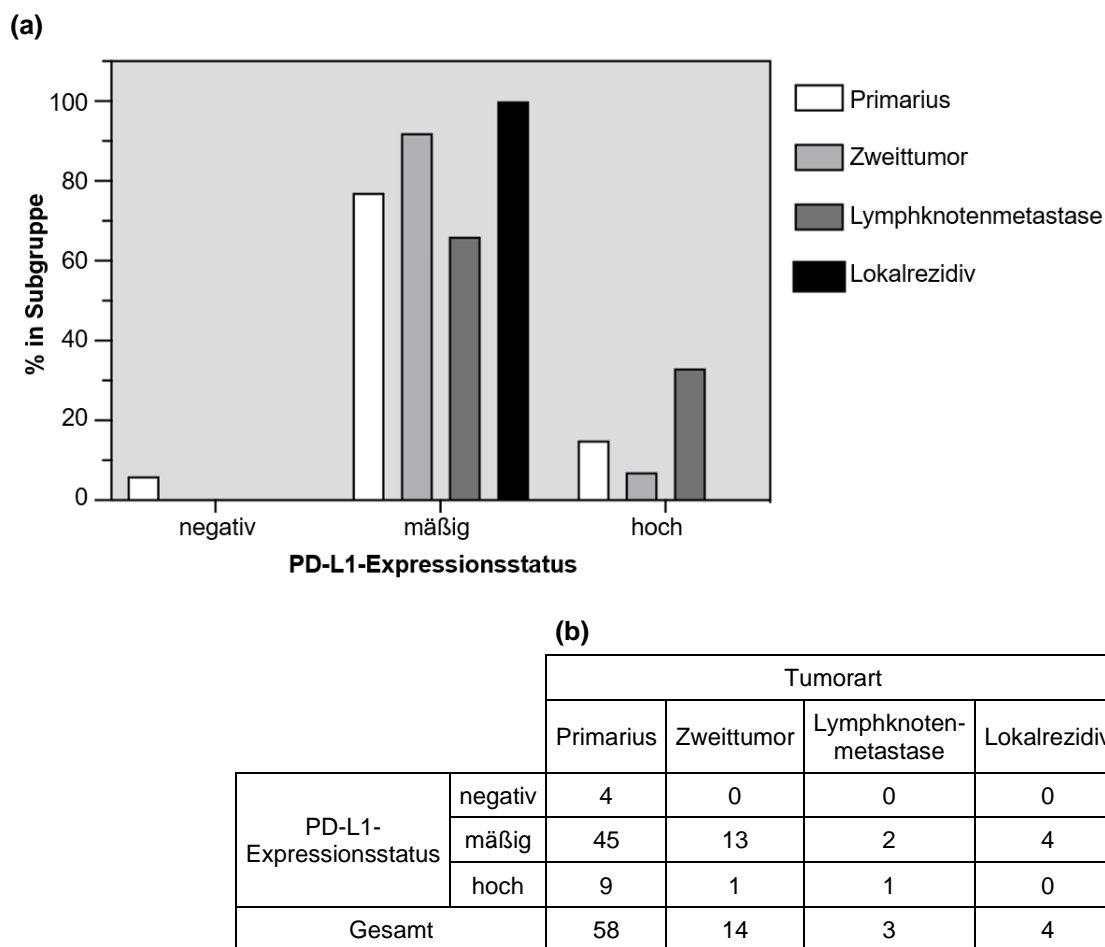


Abbildung 23: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Tumorart.

(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit der Tumorart (Primarius, Zweittumor, Lymphknotenmetastase, Lokalrezidiv). (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit der Tumorart (Primarius, Zweittumor, Lymphknotenmetastase, Lokalrezidiv). (n=79)

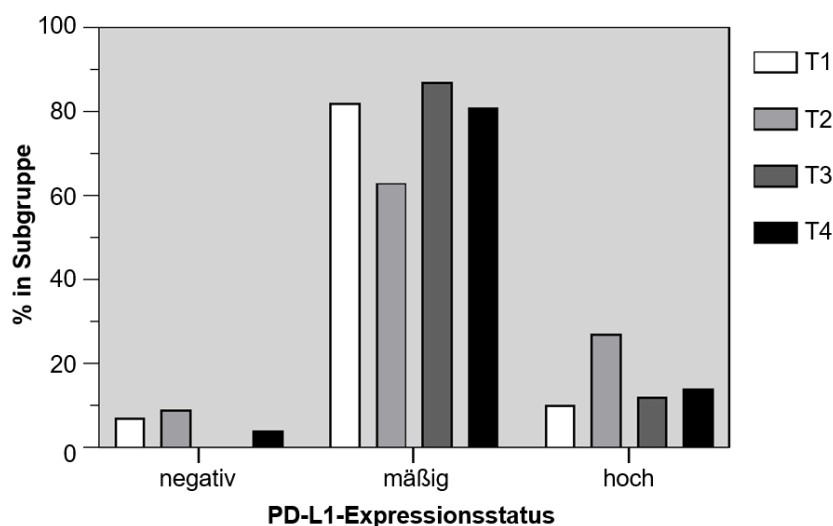
4.3.7. Assoziation von PD-L1 und TNM-Stadium

Zur Analyse, ob Tumoren zu jeder Zeit, d.h. unabhängig von ihrer Größe, PD-L1 exprimieren oder ob die Größe des Tumors Einfluss auf die Expression von PD-L1 hat - unter der Annahme, dass ein größerer Tumor mehr PD-L1 exprimieren muss als ein vergleichsweise kleinerer, um sich effektiv vor dem Immunsystem schützen zu können - wurden für insgesamt 74 Patienten, bei denen das TNM-Stadium bekannt war, diese beiden Parameter gegenübergestellt (vgl. Abbildung 24).

Bezüglich des T-Stadiums waren von 74 Patienten 27 einem T1-, 28 einem T2-, elf einem T3- und acht einem T4-Stadium zuzuordnen. Unabhängig von der Tumorgöße zeigte sich bei 81,1% ein mäßiges PD-L1-Expressionsniveau der Tumorproben, 14,9%

wiesen einen hohen, 4,1% einen negativen PD-L1-Expressionsstatus auf. Von den 3 Gewebeproben mit negativem PD-L1-Expressionsstatus wiesen 2 ein T2- und eine ein T3-Stadium auf; auf die Kategorie T1 bzw. T4 entfielen hier keine Tumoren. Unter den 60 Proben mit mäßiger PD-L1-Expression wiesen 27 (36,5%) ein T1- und 28 (27,8%) ein T2-Stadium auf. Jeweils sieben (9,5%) der Tumorproben waren als T3- bzw. T4-Stadium kategorisiert. Von den 11 Proben mit hohem PD-L1-Expressionsstatus waren vier (5,4%) dem T1-Stadium, jeweils drei (4,1%) dem T2- bzw. T3-Stadium und lediglich eine (1,4%) dem T4-Stadium zuzuordnen. Zusammengefasst zeigte sich für den Großteil der untersuchten Gewebeproben also ein T1- bis T2-Stadium bei mäßiger PD-L1-Expression. Cramers V Maßzahl beträgt 0,11; ein relevanter Zusammenhang zwischen T-Stadium und PD-L1 besteht demnach nicht.

(a)



(b)

		Tumorstatus				Gesamt
		T1	T2	T3	T4	
PD-L1- Expressionsstatus	negativ	0	2	1	0	3
	mäßig	23	23	7	7	60
	hoch	4	3	3	1	11
Gesamt		27	28	11	8	74

Abbildung 24: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Tumorstatus.

(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit dem Tumorstatus (T1-T4: zunehmendes Ausmaß der Tumorausdehnung, siehe Text). (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit dem Tumorstatus (T1-T4). (n=74)

Als nächstes wurde der Lymphknotenbefall (N-Status) betrachtet (vgl. Abbildung 25). Dabei wurde nur erhoben, ob Lymphknotenmetastasen vorhanden waren (N1) oder nicht (N0). Es wurde keine Aussage dazu getroffen, wie viele Lymphknoten befallen waren oder in welcher Region die Lymphknotenmetastasen lokalisiert waren. Für insgesamt sechs von 74 ausgewerteten Fällen blieb der Befall von Lymphknoten unbekannt. Von den 68 eingeschlossenen Patienten waren für 73,5% Lymphknotenmetastasen beschrieben; 26,5% der inkludierten Patienten wiesen keinen Lymphknotenbefall auf. Unter den 50 Patienten mit Lymphknotenmetastasen zeigten 82,0% einen PD-L1-Expressionsstatus mäßiger Ausprägung. 14% der Patienten hatten einen hohen PD-L1-Expressionsstatus, lediglich 4% einen negativen. Von 18 Patienten ohne Absiedelung von Tumorzellen in Lymphknoten zeigten wiederum 88,9% ein mäßiges PD-L1-Expressionslevel, jeweils 5,6% ein negatives bzw. hohes Ausmaß der PD-L1-Expression. Cramers V Maßzahl beträgt 0,12; ein relevanter Zusammenhang zwischen Lymphknotenmetastasierung und PD-L1 besteht demnach nicht.

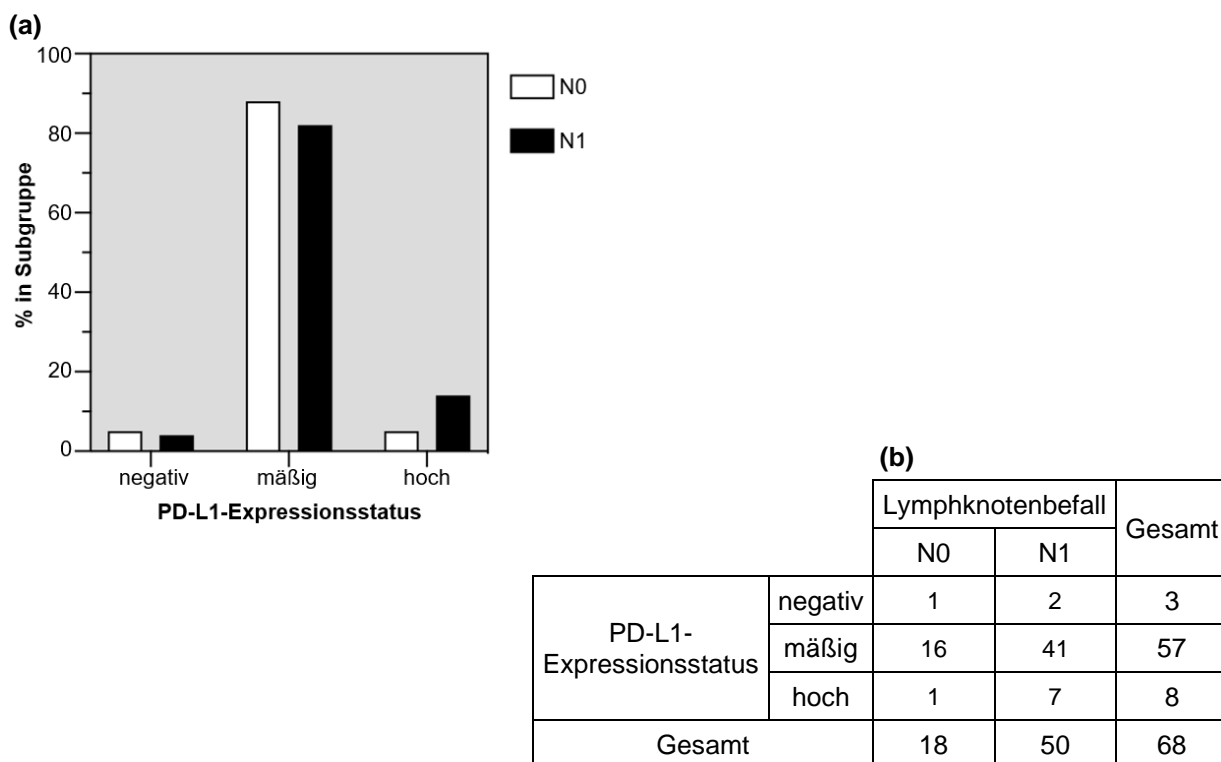


Abbildung 25: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Lymphknotenbefall.

(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit dem Lymphknotenbefall (N0: kein Lymphknotenbefall, N1: Lymphknotenbefall). (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (N0, N1). (n=68)

Im Folgenden wurde der PD-L1-Expressionsstatus mit Angaben zu einer etwaigen Fernmetastasierung korreliert. Für 24 der untersuchten Fälle waren in der Datenbank keine Angaben zur Fernmetastasierung erfasst. Wie Abbildung 26 zu entnehmen ist, wies der Großteil der übrigen 50 inkludierten Fälle keine Fernmetastasierung (M0) auf. Von den 45 Patienten mit fehlender Fernmetastasierung ließ sich bei 82,2% ein mäßiger, bei 4,4% ein negativer und für 13,3% ein hoher PD-L1-Expressionsstatus bezogen auf den Ausgangstumor feststellen. Unter den fünf Patienten mit bekannter Fernmetastasierung (M1) wiesen alle ein mäßiges PD-L1-Expressionsniveau auf. Cramers V Maßzahl beträgt 0,15. Ein relevanter Zusammenhang zwischen Fernmetastasierung und PD-L1 besteht demnach nicht.

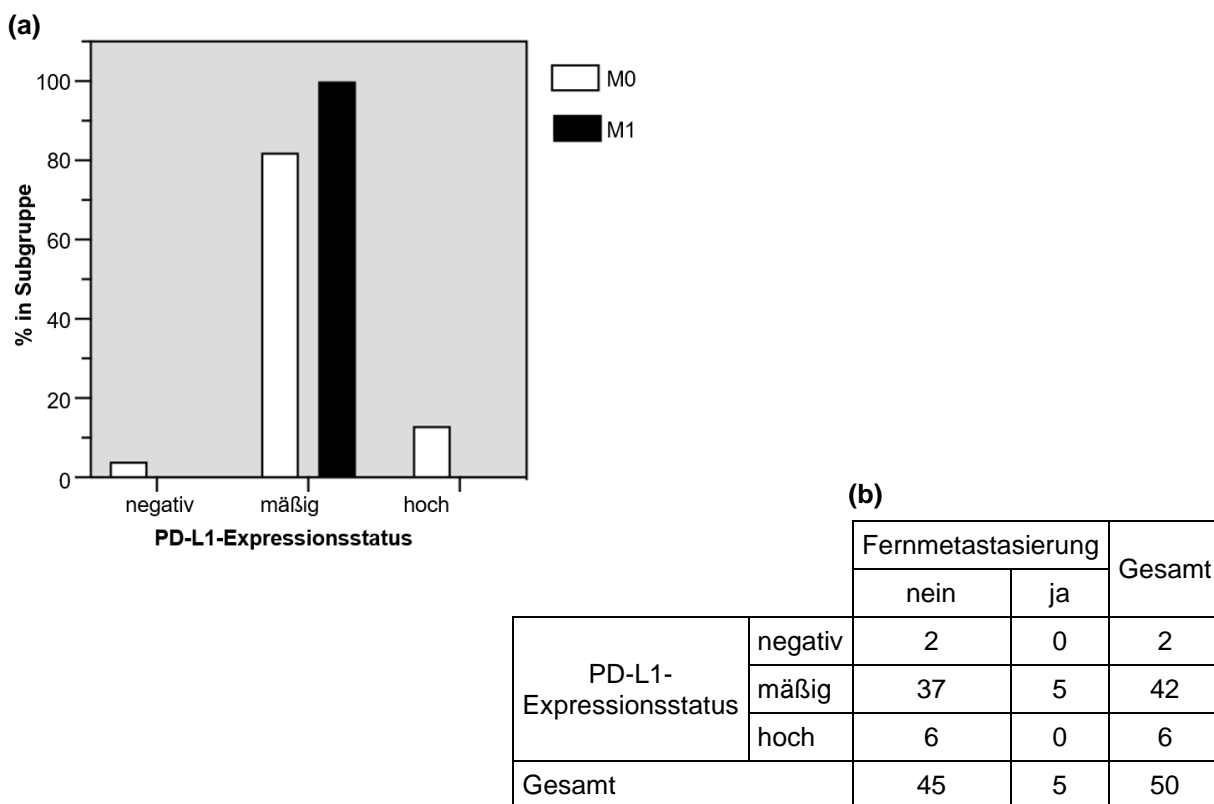


Abbildung 26: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Fernmetastasierung.

(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit der Fernmetastasierung (M0: keine Fernmetastasierung, M1: Fernmetastasierung). (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit der Fernmetastasierung (M0, M1). (n=50)

4.3.8. Assoziation von PD-L1 und Grading

Das Grading beschreibt den Grad der Differenzierung eines Tumors, wobei drei Grading-Stufen unterschieden werden. Das G1-Stadium beschreibt einen Tumor, der noch sehr viel Ähnlichkeit zu seinem Ursprungsgewebe besitzt. Das G3-Stadium kennzeichnet Tumoren, die sich nahezu völlig entdifferenziert und jegliche Kontrolle über ein geordnetes Wachstum verloren haben. Dieser Differenzierungsgrad ist dementsprechend aggressiv.

Für die vorliegende Arbeit konnten insgesamt 74 Fälle hinsichtlich PD-L1-Expressionsstatus und Grading korreliert werden. Abbildung 27 ist zu entnehmen, dass 52 der Patienten im Hinblick auf ihren Ausgangstumor ein G2-Stadium aufwiesen. Von diesen ergab sich bei 5,8% ein negativer, bei 82,7% ein mäßiger und bei 11,5% ein hoher PD-L1-Expressionsstatus. Bei 20 der Patienten wurde ein G3-Stadium diagnostiziert, wovon 5% einen negativen, 20% einen mäßigen und 70% einen hohen PD-L1-Expressionsstatus aufwiesen. Lediglich 2 der Tumoren waren als G1 klassifiziert; beide wiesen jeweils einen negativen PD-L1-Expressionsstatus auf. Cramers V Maßzahl beträgt 0,11. Ein relevanter Zusammenhang zwischen Grading und PD-L1 besteht demnach nicht.

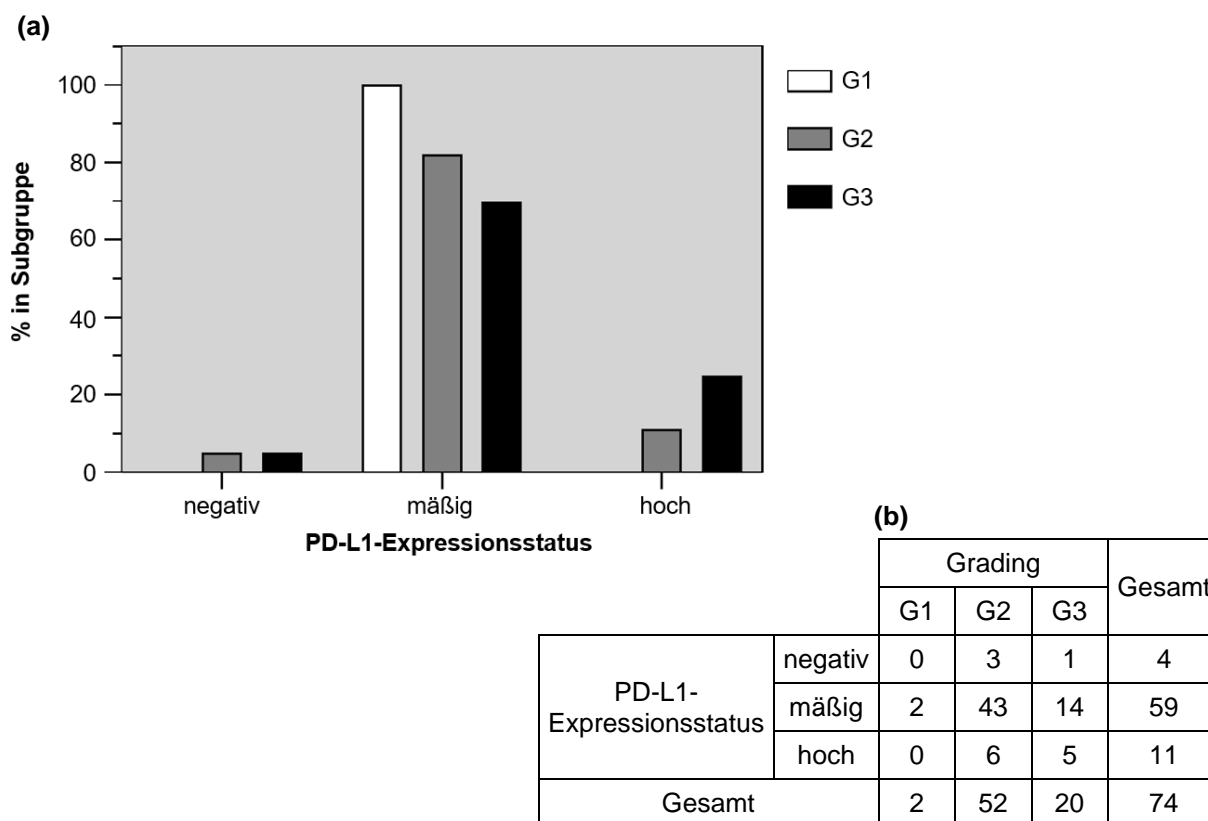


Abbildung 27: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Grading.

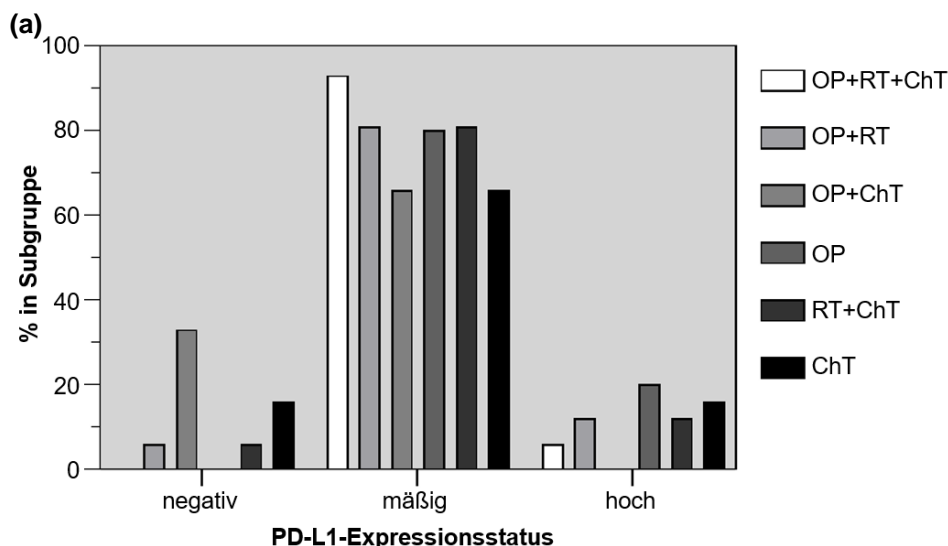
(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit dem Grading (G1-G3: zunehmender Grad der Entdifferenzierung, siehe Text). (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit dem Grading (G1-G3). (n=74)

4.3.9. Assoziation von PD-L1 und Therapieform

In den meisten Fällen werden PECA von Kopf und Hals durch eine Kombinationstherapie behandelt, da eine alleinige Therapie häufig nicht kurativ bzw. nicht ausreichend wirksam ist. Es sollte deshalb untersucht werden, ob es eine Assoziation zwischen der PD-L1-Expression und der durchgeführten Therapieform gab. Für die vorliegende Arbeit konnten insgesamt 76 Fälle ausgewertet werden.

Abbildung 28 zeigt sechs Therapieoptionen, die in der Zeit von 2005 bis 2009 zur Anwendung kamen und die, trotz Neuerungen durch die Immuntherapie, auch heute noch aktuell sind. Von den insgesamt 76 Patienten erhielten 15 eine Dreifach-Kombination aus Operation, Radiotherapie und Chemotherapie; 16 wurden durch eine duale Kombination mittels Operation und Radiotherapie behandelt; 20 der Patienten wurden ausschließlich operiert; weitere 16 wurden mittels einer Zweifachkombination als Radio-Chemotherapie behandelt, lediglich sechs erhielten ausschließlich eine

Chemotherapie und nur drei wurden durch die Kombination Operation und Chemotherapie behandelt. Von den 15 Gewebeproben der Patienten, die eine Behandlung in Form von Operation, Radio- und Chemotherapie erhielten, zeigten 14 einen mäßigen PD-L1-Expressionsstatus und nur eine wies einen hohen Expressionsstatus auf. Eine ähnliche Verteilung ließ sich auch bei den 16 Gewebeproben der Patienten feststellen, denen eine Kombinationstherapie aus Operation und Bestrahlung zu Teil geworden war. 13 dieser 16 Proben hatten einen mäßigen, zwei einen hohen und eine einen negativen PD-L1-Expressionsstatus. Von den 20 Patienten, die alleinig operiert worden waren, wiesen 16 Gewebeproben ein mäßiges, vier ein hohes und eine ein negatives PD-L1-Expressionsniveau auf. Von den 16 Patienten, die eine Radio-Chemotherapie erhalten hatten, ergab sich für 13 der zugehörigen Gewebeproben ein mäßiges PD-L1-Expressionsmuster, für zwei ein hohes und nur für eine Gewebeprobe ein negativer PD-L1-Expressionsstatus. Für die Patienten, die ausschließlich eine Chemotherapie erhalten hatten, ergab sich für vier Proben ein mäßiger PD-L1-Expressionsstatus und für jeweils eine Probe mit negativer bzw. hoher PD-L1-Expression. Zwei von drei Patienten, die mittels Operation und Chemotherapie behandelt worden waren, zeigten in den histologischen Schnitten einen mäßigen PD-L1-Expressionsstatus; der dritte exprimierte PD-L1 nicht. Cramers V Maßzahl beträgt 0,14. Ein relevanter Zusammenhang zwischen Therapieform und PD-L1 besteht demnach nicht.



(b)

		Therapieform						Gesamt
		OP + RT + ChT	OP + RT	OP + ChT	OP	RT + ChT	ChT	
PD-L1-Expressionsstatus	negativ	0	1	1	0	1	1	4
	mäßig	14	13	2	16	13	4	62
	hoch	1	2	0	4	2	1	10
Gesamt		15	16	3	20	16	6	76

Abbildung 28: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Therapieform.

(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit der Therapieform (OP: Operation, RT: Radiotherapie, ChT: Chemotherapie). (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit der Therapieform (OP: Operation, RT: Radiotherapie, ChT: Chemotherapie). (n=74)

4.3.10. Assoziation von PD-L1 und R-Status

Der R-Status beschreibt das Verbleiben von Tumorzellen (R: *residual*, lat.: zurückbleiben) nach erfolgter Therapie. Konnten alle Tumorzellen eliminiert werden, wird dies als eine R0-Situation beschrieben. War die vollständige Entfernung des Tumors nicht erfolgreich und bleibt ein mikroskopisches Residuum zurück, wird dies als R1-Status definiert. Kann keine Aussage über einen Residualtumor getroffen werden, wird dies als Rx-Status charakterisiert.

Im Hinblick auf den R-Status in Abhängigkeit des PD-L1-Expressionsstatus konnten 56 von 79 Gewebeproben analysiert werden (vgl. Abbildung 29). Für 42 von 56 der Proben ergab sich ein R0-Status, für 14 Proben ein R1-Status. Der überwiegende Teil (83,3%) der Patienten mit einem R0-Status wies in den Gewebeproben ein mäßiges PD-L1-Expressionsniveau auf; 14,3% exprimierten PD-L1 in hohem Maße. Lediglich 2,4% dieses Kollektivs zeigte keine PD-L1-Expression. Unter den 14 Fällen mit einem R1-Status zeigten 7,1% einen negativen PD-L1-Expressionsstatus; 78,6% exprimierten PD-L1 in mäßiger und 14,3% in hoher Ausprägung. Cramers V Maßzahl beträgt 0,11. Ein relevanter Zusammenhang zwischen R-Status und PD-L1 besteht demnach nicht.

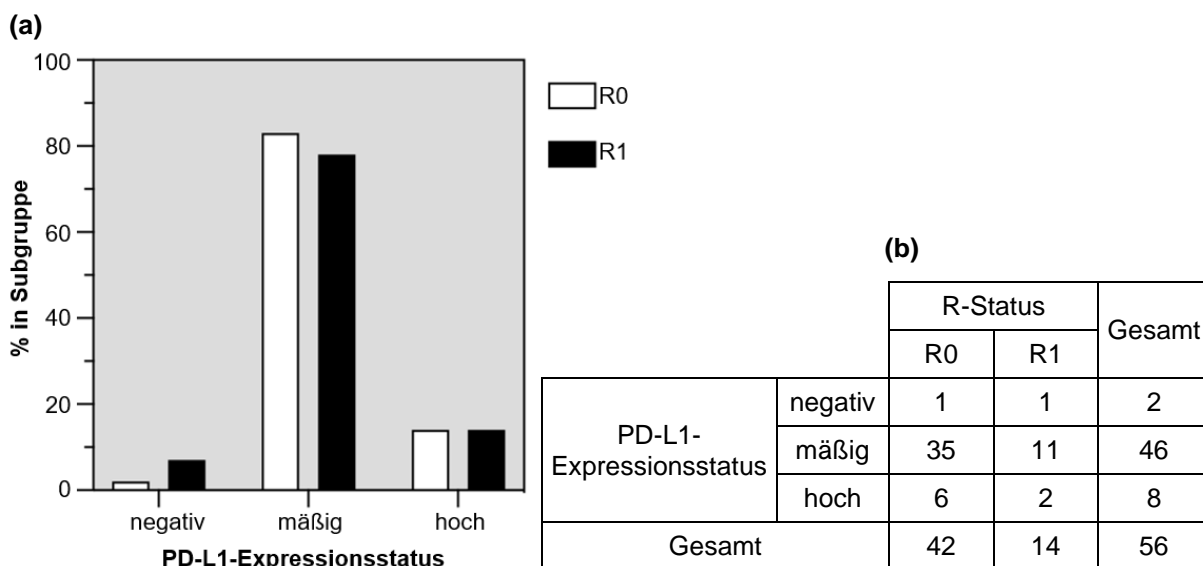


Abbildung 29: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und R-Status.

(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit dem R-Status (R0: Resektion *in toto*, R1: Residualtumor, Rx: Resektionsstatus nicht beurteilbar).
 (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit dem R-Status (R0, R1, Rx). (n=56)

4.3.11. Assoziation von PD-L1 und Tumorfreiheit

Im Falle einer R1-Situation werden Tumoren für gewöhnlich nachreseziert um eine R0-Situation anzustreben. Ist dies nicht erfolgsversprechend, wird der Versuch unternommen, die Therapie weiter zu eskalieren, z.B. mittels adjuvanter oder neoadjuvanter Chemotherapie. Ziel ist es, den Patienten vollständig von seinem Tumor zu befreien. Verbleibende Tumorzellen könnten andernfalls erneut proliferieren und so Rezidive, Metastasen oder Zweitumoren bilden. Das zu diesem Zweck

hinsichtlich einer Assoziation mit dem PD-L1-Expressionsstatus untersuchte Kollektiv umfasste 48 Patienten, da für 31 der insgesamt 79 Fälle hierzu keine Daten vorlagen. Von den 48 ausgewerteten Fällen wurden 20 kurativ behandelt, 28 waren nicht tumorfrei. Wie Abbildung 30 zu entnehmen ist, zeigten 95% des tumorfreien Kollektivs einen PD-L1-Expressionsstatus mäßiger Ausprägung; die übrigen 5% zeigten ein hohes PD-L1-Expressionsniveau. Das nicht-tumorfreie Kollektiv umfasste 10,7% mit Nachweis eines negativen, 71,4% eines mäßigen und 17,9% eines hohen PD-L1-Expressionsstatus. Cramers V Maßzahl beträgt 0,31. Ein relevanter Zusammenhang zwischen Tumorfreiheit und PD-L1 besteht demnach nicht.

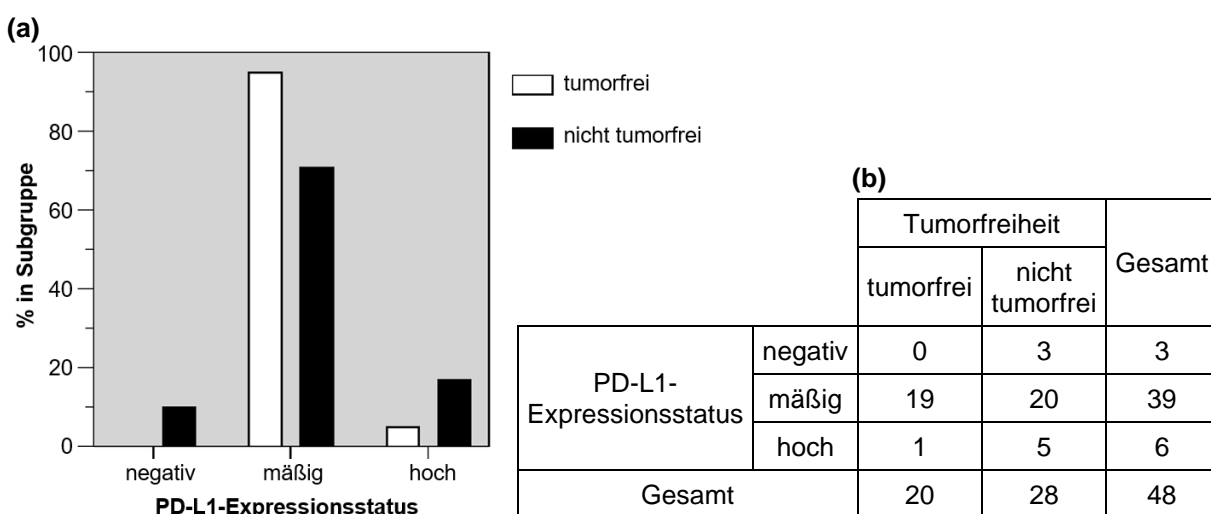


Abbildung 30: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Tumorfreiheit.

(a) Subgruppenspezifischer PD-L1-Expressionsstatus (negativ, mäßig, hoch) in % im Zusammenhang mit der Tumorfreiheit (tumorfrei, nicht tumorfrei). (b) Kreuztabelle mit den Absolutwerten der subgruppenspezifischen Verteilung der PD-L1-Expression (negativ, mäßig, hoch) im Zusammenhang mit der Tumorfreiheit (tumorfrei, nicht tumorfrei). (n=48)

4.3.12. Assoziation von PD-L1 und Gesamtüberleben

Um zu untersuchen, ob der PD-L1-Expressionsstatus das Gesamtüberleben von Patienten mit PECA der Kopf-Hals-Region beeinflusst, wurde das PD-L1-Expressionsniveau in Assoziation zu den Überlebensdaten der Patienten gesetzt. Für die Berechnung wurde dabei der Zeitraum des Überlebens ab dem Diagnosezeitpunkt definiert; d.h. unberücksichtigt blieb das Hinzutreten anderer Morbiditäten oder das Auftreten eines Rezidivs, Zweittumors oder einer Metastasierung. Abbildung 31 veranschaulicht die Überlebenszeit der Patienten in Monaten in Abhängigkeit des PD-L1-Expressionsstatus der korrespondierenden Gewebeproben. Insgesamt konnten die Überlebensdaten für 79 Patientenfälle ausgewertet werden. Von diesen konnten vier der Kategorie PD-L1-Expressionsstatus „negativ“, 64 der Kategorie „mäßig“ und zehn der Kategorie „hoch“ zugeordnet werden. Die Kreuze innerhalb der einzelnen Kurven stellen Zensierungen dar, wobei es sich um Ereignisse handelt (z.B. Weiterbehandlung in einem anderen Klinikum, Wegzug), die dazu führten, dass Patienten für eine weitere Betrachtung ausschieden. Unter den Fällen, deren Gewebeproben der Kategorie negative PD-L1-Expression zuzuordnen waren, traten zwei solcher Ereignisse auf; bei den Fällen mit mäßiger PD-L1-Expression konnten 27 Ereignisse und in der Kategorie mit hoher PD-L1-Expression sieben Ereignisse registriert werden. Wie den Kurven zu entnehmen ist, zeigte sich für das betrachtete Gesamtkollektiv ein schlechteres Überleben für Patienten mit hohem PD-L1-Expressionsstatus gegenüber denjenigen mit mäßiger PD-L1-Expression. Von den insgesamt vier Patienten mit negativem PD-L1-Expressionsstatus verstarb einer kurz nach der Diagnosestellung. Der Patient mit der längsten Überlebenszeit bei negativem PD-L1-Expressionsstatus überlebte nach Diagnosestellung noch etwa 30 Monate. In dem Kollektiv mit einem mäßigen PD-L1-Expressionsstatus verstarb der früheste ebenfalls kurz nach Diagnosestellung, der am längsten überlebende Patient etwa 130 Monate nach Feststellung der Diagnose. Von den zehn Patienten mit hohem PD-L1-Expressionsstatus verstarb einer ca. 30 Tage nach Diagnosedatum. Der Patient, der bei hoher PD-L1-Expression am längsten überlebte, verstarb ca. 100 Monate nach Diagnosestellung. Die Kurve für diejenigen mit negativem PD-L1-Expressionsstatus suggeriert zwar ebenfalls schlechtere Überlebenschancen, jedoch überschneiden sich die Kurven von Patienten mit einem negativen und denen eines mäßigen PD-L1-Expressionsstatus. Die Überschneidung der Kurven kommt durch das sehr kleine

Kollektiv mit „PD-L1 negativ“ zustande. Wie aus Abbildung 31 ersichtlich, ist diese Assoziation als statistisch relevant zu werten ($p=0,05$), wonach ein höherer PD-L1-Expressionsstatus mit einer geringeren Überlebenszeit korrespondiert.

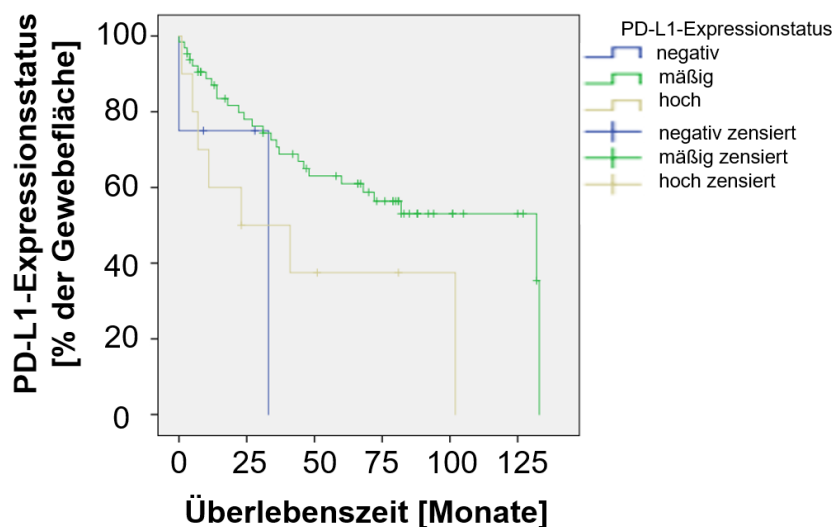


Abbildung 31: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Gesamtüberleben.

PD-L1-Expressionsstatus [% der Gewebefläche] in Bezug auf die Überlebenszeit [Monate]. PD-L1-Expressionsstatus negativ (blaue Kurve), mäßig (grüne Kurve), hoch (gelbe Kurve), negativ zensiert (blaues Kreuz), mäßig zensiert (grünes Kreuz), hoch zensiert (gelbes Kreuz). (n=78, $p: 0,05$)

4.3.13. Assoziation von PD-L1 und rezidivfreier Zeit

Für die Beurteilung des Einflusses einer verstärkten PD-L1-Expression auf die rezidivfreie Zeit von Patienten mit PECA des Kopf- und Halsbereiches wurde diese der Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs gegenübergestellt. Für die Berechnung wurde dabei der Zeitraum vom Diagnosezeitpunkt bis zum Auftreten eines Rezidivs definiert. Abbildung 32 sind die Zeiten in Monaten bis zum Auftreten eines Rezidivs zu entnehmen. Die Farbe der Kurven ist analog zu denen für das Gesamtüberleben (vgl. Abbildung 31). Die Kreuze innerhalb der Kurven fehlen hier, da keine Zensierung erfolgte und demnach kein Patient von einer weiteren Beobachtung ausgeschlossen wurde. Insgesamt entwickelten 38 Patienten des Gesamtkollektivs ein Rezidiv. Von diesen ergab sich für lediglich zwei Patienten ein negativer, für 32 ein mäßiger und für vier ein hoher PD-L1-Expressionsstatus. Es zeigte sich ferner, dass sich die Konfidenzintervalle der Mediane für die drei Kategorien unterscheiden und relativ in ihrer Spannweite variieren, wenngleich das Kollektiv PD-L1 „negativ“ und PD-L1

„hoch“ in dieser Assoziation weniger stark auseinanderliegen als bei Betrachtung in Hinblick auf das Gesamtüberleben. Bei zwei Patienten mit negativem PD-L1-Expressionsstatus trat bei einem Patienten ein Rezidiv nach ca. fünf und bei einem anderen nach ca. 8 Monaten auf. Unter den 32 Patienten mit mäßigem PD-L1-Expressionsstatus trat das früheste Rezidiv nach ca. einem Monat auf; der Patient, der am längsten ohne Rezidiv lebte, blieb ca. 145 Monate tumorfrei. Hinsichtlich der insgesamt vier Patienten mit einem hohen PD-L1-Expressionsstatus ergab sich das früheste Rezidiv nach ca. vier Monaten und die längste rezidivfreie Zeit in dieser Kategorie betrug ca. 22 Monate. Die mediane Zeit bis zum Auftreten eines Progresses betrug in der Kategorie PD-L1 „mäßig“ schätzungsweise 21 Monate und für PD-L1 „hoch“ schätzungsweise zehn Monate. Diese Ergebnisse sind als statistisch relevant zu werten.

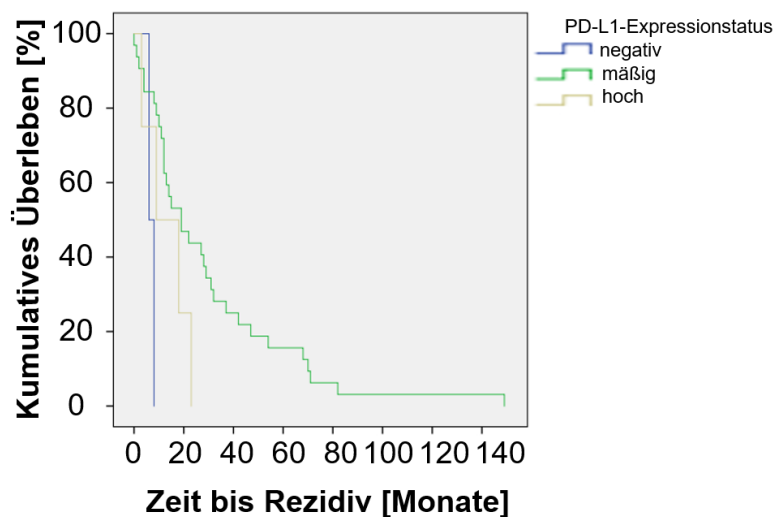


Abbildung 32: Assoziation von PD-L1-Expressionsstatus und Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs.

Kumulatives Überleben [%] in Bezug auf die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs [Monate]. PD-L1-Expressionsstatus negativ (blaue Kurve), mäßig (grüne Kurve), hoch (gelbe Kurve). (n=38, p: 0,02)

5. Diskussion

Der PD-1:PD-L1-Signalweg ist ein wichtiger Checkpoint unseres Immunsystems, der einerseits der Herstellung einer Balance zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen dient und somit daran beteiligt ist, eine zu schwache oder überschießende Immunantwort zu verhindern, andererseits Tumoren dienlich ist, um sich vor dem Immunsystem zu maskieren.

Der Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren - wie beispielsweise Pembrolizumab - hat sich innerhalb kürzester Zeit zu einer wichtigen onkologischen Therapieoption entwickelt, bei der jedoch wünschenswert wäre, dass eine personalisierte Diagnostik i.S. prädiktiver oder prognostischer Marker erfolgt, um die Zahl unnötig Behandelter zu reduzieren und den größtmöglichen Benefit für Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit für ein Therapieansprechen zu erzielen [37]. Die Wirksamkeit einer Therapie mit einem Checkpoint-Inhibitor wie Pembrolizumab beruht auf der Expression von PD-L1 im Mikromilieu von Tumoren, was dazu führt, dass PD-1-positive T-Zellen deaktiviert werden und somit die Fähigkeit zum Tumorangriff verlieren [73]. Durch Blockade von PD-1 mittels monoklonaler Antikörper kann PD-L1 nicht mehr an PD-1 binden und die T-Zelle bleibt aktiv an der Bekämpfung des Tumors beteiligt.

Als Voraussetzung für einen Therapieerfolg mit PD-1-Antikörpern wie Pembrolizumab gilt die Prävalenz PD-L1-positiver Tumoren und der dazugehörigen Immunresponse PD-1-positiver Lymphozyten, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind. Hypothese dieser Arbeit war es, dass PECA der Kopf-Hals-Region PD-L1 exprimieren und dass dies den Verlauf der Erkrankung bzw. klinische Parameter, die Aggressivität des Tumors sowie die Überlebenszeit negativ beeinflusst. Wenngleich es einige Studien gibt, welche die Prävalenz von PD-L1 untersuchen, so ist die Literatur mit Blick auf eine Assoziation zu klinisch-pathologischen Parametern in Bezug auf PECA des Hals-Kopf-Bereiches bisher jedoch noch rar und z.T. uneinheitlich. Die Erfassung der PD-L1-Expression durch verschiedene Tests erschwert darüber hinaus die Vergleichbarkeit der Ergebnisse klinischer Studien [37]. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl das Gesamtüberleben als auch die rezidivfreie Zeit für Patienten mit PECA der Kopf-Hals-Region negativ durch die PD-L1-Expression beeinflusst wird.

Die Kaplan-Meier-Kurven für die PD-L1-Kategorien „mäßig“ und „hoch“ demonstrieren, dass die Wahrscheinlichkeit für Patienten mit hohem PD-L1 Status innerhalb des hier beobachteten Zeitraums noch zu leben geringer ist als bei Patienten mit mäßigem PD-L1 Status. Abbildung 31 zeigt auf, dass nach 50 Monaten noch etwa 60% der Patienten mit einem mäßigen PD-L1-Expressionslevel leben, wohingegen es von den Patienten mit einem hohen PD-L1-Expressionsniveau nur etwa 35% sind. Die Überlebensfunktion von PD-L1-negativ kann an dieser Stelle nicht sinnvoll interpretiert werden, da die Stichprobe zum Vergleich mit den beiden anderen Überlebensfunktionen viel zu klein ist. Dies gilt in ähnlicher Weise auch für die Kategorie PD-L1-hoch, wenngleich diese Kategorie eine höhere Fallzahl beinhaltet. Mit Blick auf den doch sehr deutlichen Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeiten zwischen PD-L1-mäßig und -hoch in der hier vorliegenden Arbeit, wäre es jedoch sehr unwahrscheinlich, dass sich selbst bei deutlicher Erhöhung der Fallzahl für PD-L1-hoch eben dieser Unterschied komplett aufhebe. Abbildung 31 lässt sich ferner entnehmen, dass in allen 3 PD-L1-Kategorien die größte beobachtete Zeit tatsächlich auch eine Ereigniszeit - nämlich der Tod - war. Dies erscheint auf den ersten Blick etwas ungewöhnlich, ist mit Blick auf das zumeist hohe Alter zum Diagnosezeitpunkt jedoch erklärbar. Es ist also gut denkbar, dass ein Patient, bei dem die Diagnose beispielsweise im Alter von 70 Jahren gestellt wurde, 10 Jahre später verstorben ist, unabhängig davon, ob dies an der Tumorerkrankung oder einer anderen Todesursache lag.

Die Ergebnisse für die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit decken sich u.a. mit drei Metaanalysen für das nicht kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) sowie der Keynote-001-Studie und Studien zum malignen Melanom [37, 74]. Bei den genannten Tumorentitäten handelt es sich um recht aggressive Malignome, die häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden, und für deren Aggressivität PD-L1 inzwischen als mitverantwortlich gilt [37, 74]. Die in der Literatur beschriebene PD-L1-Positivität zeigt nicht nur für Tumoren derselben Entität, sondern auch für Tumoren unterschiedlichen Gewebsursprungs deutliche Schwankungen [37]. Das Problem bei der Erhebung des PD-L1-Expressionsstatus sind dabei zum einen Unterschiede bei der Methodik (z.B. konventionelle IHC, TMA oder quantitative Immunfluoreszenz), eine Präzisionslücke bzgl. einer Definition für PD-L1-positiv sowie

die Komplexität des Immunsystems und die Präsenz von Immunzellen im und um den Tumor herum [37].

Für die Erhebung des PD-L1-Status wurden für die vorliegende Arbeit TMA angefertigt, die immunhistochemisch gefärbt wurden. Für die Anfertigung eines TMA sollten Gewebeareale mit möglichst viel Tumorgewebe aber wenig Nekrose und Stroma ausgewählt werden. Das Problem bei TMA ist jedoch, dass PECA der Kopf-Hals-Region sehr heterogen sind und das TMA lediglich einen sehr kleinen Anteil der gesamten Tumorbilastung des Körpers darstellt, wodurch die entnommene Probe evtl. nicht repräsentativ für den PD-L1-Status des gesamten Tumorgewebes ist. Wie *Hofman et al.* an einem Beispiel illustrierten, kann der Anteil PD-L1-positiver Tumorzellen in verschiedenen Biopsaten ein und desselben Tumors durchaus zwischen <1% und >50% liegen [37, 75].

Methodische Unterschiede, die die z.T. große Spannbreite des PD-L1-Status für Tumoren verschiedener Studien ebenfalls erklären könnten, sind uneinheitliche Ausgabeparameter bei der Analyse, wie z.B. „Anzahl positiver Zellen“, „prozentualer Anteil positiver Zellen“ oder „positive Zellen pro Fläche“.

Für die statistische Auswertung dieser Arbeit wurde vor dem Hintergrund einer besseren Vergleichbarkeit und starken Heterogenität von PECA - z.T. auch wegen Größenunterschieden der Gewebeproben - der prozentuale Anteil positiver Zellen für die jeweilige Färbung erhoben und im Sinne einer Plausibilitätsprüfung mit der absoluten Zahl an positiven Zellen verglichen.

Die o.g. Problematik der fehlenden Uniformität von Scoring-Systemen zur Erfassung des PD-L1-Status zeigte sich auch in dieser Arbeit. Für die Erfassung des PD-L1-Status werden sehr häufig der sog. *Tumor proportion score (TPS)* oder der *combined positive Score (CPS)* verwendet. TPS sind definiert als der prozentuale Anteil an Tumorzellen mit einer kompletten oder partiellen membranösen Anfärbbarkeit irgendeiner Intensität. [71] Der TPS bewertet im Gegensatz zum CPS ausschließlich die Membranfärbungen in Tumorzellen und wird vorrangig bei NSCLC, Melanomen und Karzinomen der Kopf-Hals-Region eingesetzt, wohingegen der CPS auch oder ausschließlich PD-L1-Färbungen in bestimmten Immunzellen berücksichtigt [76]. Die Festlegung von *Cut-off*-Werten für den TPS ist in der bisherigen Literatur nicht eindeutig definiert und variiert darüber hinaus in Abhängigkeit vom eingesetzten PD-L1-Antikörper für die IHC [71]. Die Spannweite von *Cut-off*-Werten anderer Autoren

zur Charakterisierung der PD-L1-Positivität ist groß und beinhaltet je nach Studie eine variable Abstufung. Geläufig ist durchaus eine Graduierung der *Cut-offs* bei 1%, 5%, 10%, 25% und 50% [71]. Für die vorliegende Arbeit wurden zwei *Cut-offs* gewählt; einer bei 1%, der andere bei 50% Positivität. Für die Betrachtung der Überlebensdaten wäre die Festlegung mehrerer Kategorien bzgl. des TPS bei der verhältnismäßig geringen Anzahl an Proben möglicherweise aufgrund einer fehlenden Vergleichbarkeit weniger transparent gewesen. Vielleicht hätte sich bei einer größeren Anzahl an *Cut-offs* aber auch eine stärkere Tendenz erkennen lassen, ab welchem prozentualen PD-L1-Anteil des Tumors eine signifikant stärkere Mortalität zu verzeichnen ist. Für den Einsatz von Biologicals wie Pembrolizumab scheint dies jedoch irrelevant zu sein. Die meisten Studien, die PD-L1 mit Überlebensdaten korrelierten, untersuchten nicht den direkten Effekt von PD-L1 auf die Überlebenszeit oder die progressionsfreie Zeit, sondern die Wirkung eines Checkpoint-Inhibitors bei vorbekanntem PD-L1-Status auf die Überlebensdaten. Die Frage nach der Überlebenszeit ist also weniger vom Ausmaß eines positiven PD-L1-Status als vielmehr von der gewählten Therapie abhängig. Dies wiederum erfordert eine Standardisierung von Testverfahren zur Erfassung des PD-L1-Status unter Berücksichtigung der angewandten *Cut-off*-Werte. *Dolled-Filhart et al.* kamen zu dem Schluss, dass die einfachste Methode zur Erfassung der PD-L1-Positivität für die klinische Praxis, die zu sein scheint, die Tumoren als positiv für PD-L1 wertet, wenn diese eine Anfärbbarkeit von $\geq 50\%$ aufweisen [37]. Dafür spricht, dass ein hohes PD-L1-Expressionsniveau ein besseres Therapieansprechen auf Immuntherapeutika verspricht [71, 77, 78]. In der Literatur finden sich jedoch auch Angaben dafür, dass einige Tumoren mit einem TPS $<50\%$ auf Pembrolizumab reagierten, andere mit einem TPS $\geq 50\%$ dies aber nicht taten [37]. Mehrere Studien belegen zudem, dass sogar bei einigen Patienten mit einem negativen PD-L1-Status ein signifikantes Ansprechen auf Checkpoint-Inhibitoren beobachtet werden konnte [71, 79]. Ein Grund hierfür könnte ebenfalls die Heterogenität von PECA des Kopf-Hals-Bereichs oder aber auch die Bildung von Epitopen sein [80].

Ein anderes Problem, das sich bei der Betrachtung der Überlebensdaten von Patienten mit Tumoren irgendeiner Ausprägung von PD-L1 ergibt, ist die komplexe Wirkweise des Immunsystems sowie die tatsächliche Präsenz von Immunzellen im Tumormikromilieu. Es stellt sich die Frage, inwieweit der PD-1:PD-L1-Signalweg

alleine Einfluss auf die Tumorbiologie und damit auf die Überlebenszeiten der Patienten hat oder inwieweit andere Komponenten und Signalkaskaden des Immunsystems im Zusammenwirken hierauf Einfluss nehmen [71]. Um diesbezügliche Indizien zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur der PD-L1-Status erhoben, sondern auch das tumorbegleitende Entzündungsinfiltrat anhand von Oberflächenmarkern für CD3, CD4, CD8, CD56, CD68 und PD-1 charakterisiert. Wie sich für diese Arbeit herausstellte, korreliert die PD1-Positivität mit der PD-L1-Expression. Dieses Ergebnis wurde hier als nicht signifikant gewertet, spiegelt jedoch klar einen erkennbaren Zusammenhang wider (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 7). In einer Studie von *Malaspina et al.* konnte eine erhöhte Expression von PD-1 auf Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit PECA von Mundhöhle und Oropharynx nachgewiesen werden. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass in den besagten Läsionen eine Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor stattfindet, die sich Prognose-limitierend bzw. mortalitätserhöhend auswirkt [31]. Ein großer oder aggressiver PD-L1-exprimierender Tumor benötigt vermutlich mehr PD-1-positive Lymphozyten in seiner direkten Umgebung zur Erzeugung eines ausreichend starken inhibitorischen Signals i.S. einer Immunsysteminaktivierung im Vergleich zu einem kleinen bzw. weniger aggressiven Tumor. Der Grund für eine fehlende Signifikanz bezüglich des Zusammenhangs von PD-L1-Positivität und PD-1-Expressionsstatus könnte in der Heterogenität der verschiedenen PECA begründet liegen. Diese Heterogenität könnte letztlich auch ursächlich dafür sein, dass in den hier ausgewerteten Daten eine fehlende Normalverteilung und eine dadurch bedingte Rechtsschiefe vorliegt.

Ein anderer histologischer Parameter, für den sich klar eine positive Assoziation mit PD-L1 ergab, ist der Oberflächenmarker CD3. Die Hauptpopulation der Leukozyteninfiltrate in Oralkarzinomen stellen CD3-positive Zellen dar [31]. Der PD-1:PD-L1-Signalweg führt, wie mehrere Studien zeigen konnten, zu einer Herunterregulation einer CD3/ CD28-stimulierten Antwort, was in Folge eine starke TZR-vermittelte Proliferationshemmung von T-Zellen bedingt [32]. Das Resultat der PD-1:PD-L1-Interaktion ist dabei von der Stärke des CD3/ CD28-Signals abhängig [32]. Wie sich für diese Arbeit zeigte, erhöht sich mit steigendem PD-L1-Expressionsniveau auch der prozentuale Anteil an CD3-positiven Zellen. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studienergebnissen. So konnte etwa bei

Melanompatienten mit metastasiertem Sentinel-Lymphknoten gezeigt werden, dass eine tumorale PD-L1-Expression signifikant mit der Anwesenheit von intratumoralen CD3-Lymphozyten korreliert ist [79]. Wie *Kakavand et al.* darüber hinaus zeigen konnten, scheint eine höhere Dichte an tumorinfiltrierenden CD3-positiven Lymphozyten offenbar nicht nur mit einem verbesserten rezidivfreien Überleben, sondern auch Gesamtüberleben assoziiert zu sein [79]. Der Effekt einer höheren CD3-Dichte auf Überlebensdaten wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. CD3 ist als ein Proteinkomplex auf der Oberfläche von T-Zellen maßgeblich an der Aktivierung von Lymphozyten beteiligt. T-Zellen können korrespondierende Liganden für PD-1 - insbesondere nach der TZR-Stimulation und sogar in Abwesenheit der CD28-Costimulation - exprimieren [25], was ein Erklärungsansatz für die positive Assoziation von PD-L1-Expression und CD3-Positivität sein könnte. Die Anwesenheit von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) im Mikromilieu des Tumors ist nicht nur mit einer besseren Prognose, sondern auch mit einem besseren Therapieansprechen bei unterschiedlichen Tumorentitäten assoziiert [43]. Es existieren verschiedene Lymphozyten-Untergruppen, die z.T. verschiedene oder sogar entgegengesetzte Funktionen in der direkten Tumorumgebung erfüllen. Ein Beispiel hierfür sind CD4- positive Immunzellen, deren Rolle im Rahmen der Tumorabwehr bis heute nicht abschließend geklärt ist. Die zahlreichen CD4-Subtypen erfüllen teils inhibitorische, teils stimulatorische Funktionen [43, 44, 81]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, korreliert die CD4-Positivität nicht mit dem Ausmaß der PD-L1-Expression, denn für alle drei PD-L1-Kategorien ergaben sich vergleichbare Werte der CD4-Positivität (vgl. Abbildung 10 und Abbildung 11). Dies könnte durch die vielfältigen Funktionen CD4-positiver Immunzellen begründet sein. Ferner erlaubt die hier angewandte Methode der IHC letztlich nur Aussagen darüber, ob eine Zelle CD4-positiv ist oder nicht; eine Diskriminierung der in der Gewebeprobe enthaltenen CD4-Subtypen gelingt jedoch nicht. Somit lassen sich keine Rückschlüsse auf den Stellenwert von CD4 (i.e. stimulierend oder inhibierend) in der PD1:PD-L1-Signalkaskade von PECA des Kopf-Hals-Bereiches ziehen. In einer Studie von *Lyford-Pike et al.* konnte demonstriert werden, dass sowohl für CD4- als auch für CD8-Positivität eine positive Assoziation zur PD-L1-Expression besteht [61]. Auch in der vorliegenden Arbeit korreliert das Ausmaß der PD-L1-Expression mit dem Nachweis CD8-positiver Zellen. Wenngleich die Ergebnisse als statistisch

nicht-signifikant gewertet wurden, so ergibt sich durch Mittelwertvergleich (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 13) doch eine deutliche Tendenz, dass der Anteil CD8-positiver Zellen mit steigendem PD-L1-Expressionstatus steigt. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von *Lyford-Pike et al.*, wo gleiche oder aber sogar höhere CD8-Spiegel auf tumorinfiltrierenden T-Zellen gegenüber CD4-positiven Zellen nachgewiesen werden konnten [61]. Eine weitere Studie von *Brown et al.* konnte zeigen, dass PD-Liganden die CD8-vermittelte T-Zellaktivierung effektiver inhibieren als die der CD4-T-Zellen und dass insbesondere PD-L1 die CD8-vermittelte Lyse inhibiert [30]. Diese Effekte untermauern einmal mehr, dass PD-L1 höchstwahrscheinlich von Tumoren zur Deeskalation einer antitumoralen Immunantwort genutzt wird [30, 38, 82]. Schlussfolgernd ist es ebenfalls denkbar, dass höhere Konzentrationen von Immunzellen mit diesen Oberflächenmarkern erforderlich sind und in das peritumorale Milieu rekrutiert werden, um einer vollständigen Inhibition der Immunantwort durch PD-L1 entgegenzuwirken.

Bei der Untersuchung von Oralkarzinomen durch *Malaspina et al.* korrelierte die tumorale Expression von PD-L1 direkt mit einer schlechteren Prognose und indirekt proportional mit dem Vorhandensein CD8-positiver, tumorinfiltrierender T-Zellen [31, 43]. Auch in einer Metaanalyse von *de Ruiter et al.* konnte gezeigt werden, dass sowohl HPV-negative als auch HPV-positive Patienten offenbar von einer hohen Anzahl an CD8-positiven tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten profitieren, da sich eine deutliche Assoziation bezüglich eines positiven klinischen Verlaufs bei Patienten mit einem PECA des Kopf-Hals-Bereiches zeigte [43, 57].

Eine weitere Feststellung dieser Arbeit ist die signifikant positive Assoziation von CD68-Positivität und PD-L1-Expressionsstatus. Dieses Ergebnis deckt sich wiederum mit den Erkenntnissen von *Lyford-Pike et al.*, die über eine Co-Lokalisation von CD68 und PD-L1 im Mikromilieu von HPV-assoziierten PECA des Kopf-Hals-Bereiches berichten [61]. Auch in Studien zum hepatozellulären Karzinom (HCC) konnten Makrophageninfiltrationen positiv mit der PD-L1-Expression korreliert werden, woraus geschlossen wurde, dass das Makrophagen-beinhalten Mikromilieu des Tumors eine verstärkte PD-L1-Expression evoziert und über die PD-1:PD-L1-Kaskade eine adaptive Resistenz bewirkt [83, 84]. In der vorliegenden Arbeit konnte die tumorale PD-L1-Expression sowohl mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit ($p: 0,05$) als auch mit einer höheren rezidivfreien Zeit ($p: 0,02$) assoziiert werden. Andere Autoren

konnten einen negativen Effekt hoher CD68-Spiegel auf Überlebensdaten bei Patienten mit einem PECA des Kopf-Hals-Bereiches nachweisen [11, 53, 57], was – wie oben beschrieben – durch hohe PD-L1-Expression erklärbar wäre, zumindest jedoch nicht im Widerspruch zu den Erkenntnissen dieser Arbeit steht. Die positive Assoziation von CD68 und PD-L1 ist sehr wahrscheinlich Ausdruck eines synergistischen Effekts, der sich offenbar nicht nur für HCC zeigt. Die alleinige Induktion von PD-L1 auf der Tumoroberfläche durch tumorassoziierte Makrophagen erscheint unwahrscheinlich, da in der Arbeit von *Lyford-Pike et al.* ebenfalls PD-L1-negative Tumoren z.T. einen hohen Anteil an tumorinfiltrierenden Lymphozyten aufwiesen [61].

Der Anteil an CD56-positiven Zellen am tumorbegleitenden Entzündungsinfiltrat von den hier untersuchten Tumoren ist sehr gering, sodass angenommen werden kann, dass CD56 bei PD-L1-positiven PECA eher eine untergeordnete Rolle spielt, wenngleich sich mit steigender PD-L1-Expression eine Abnahme des prozentualen Anteils von CD56-exprimierenden Zellen zeigt. Möglicherweise spiegelt dies einen Effekt von PD-L1 auf T-Zellen wider, da bei ausbleibender T-Zell-Aktivierung kein oder zumindest weniger CD56 exprimiert wird. Die geringe Stichprobengröße erlaubt diesbezüglich jedoch nur Vermutungen; da die statistische Testung der vorliegenden Ergebnisse keine Relevanz ergibt.

Das Durchschnittsalter zum Diagnosezeitpunkt von Patienten mit einem PECA des Kopf-Hals-Bereiches betrug für das hier untersuchte Kollektiv 62,2 Jahre, was sich mit Literaturangaben deckt, wonach ein PECA des Kopf-Hals-Bereiches bevorzugt im höheren Lebensalter auftritt; im Mittel zwischen der 6. und 7. Lebensdekade [4, 13, 23, 63]. Von den insgesamt 79 Gewebeproben wiesen 75 einen mäßigen oder sogar hohen PD-L1-Expressionsstatus auf, was die Rolle von PD-L1 in der Pathogenese von PECA unterstreicht. Von diesem gepoolten Kollektiv war der jüngste Patient 35 Jahre und der älteste 72 Jahre alt, was in der vorliegenden Arbeit eine große Spannweite des Parameters *Alter* verdeutlicht. Wenngleich sich aufgrund der kleinen Stichprobenzahl im Kollektiv PD-L1-negativ (n=4) und aufgrund der großen Spannweite im Kollektiv PD-L1-mäßig und -hoch kein signifikanter Unterschied ergab, so ist dies dennoch ein Indiz dafür, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen PD-L1-Positivität und Alter besteht. Jüngere Patienten zeigen tendenziell einen höheren PD-L1-Expressionsstatus. Ein Grund hierfür könnte sein, dass PECA bei

jüngeren Patienten häufig HPV-assoziiert sind und HPV-positive PECA wiederum verstärkt PD-L1 exprimieren, da eine verstärkte PD-L1-Expression das betroffene Gewebe für eine HPV-Infektion privilegiert [10, 61]. Ob eine HPV-Infektion jedoch direkten Einfluss auf das Expressionsniveau von PD-L1 hat, kann aktuell nicht abschließend beantwortet werden [36]. Unterschiede zwischen HPV-positiven und -negativen PECA von Kopf und Hals erklären sich möglicherweise auch dadurch, dass die Expression des Rezeptors PD-1 auf Effektor-T-Zellen sowohl ein Indiz für die Asthenie der Zelle selbst als auch für eine stärkere Sensibilität derselben gegenüber PD-L1-vermittelten Apoptose-Signalen sein kann [38, 62]. Nicht zuletzt sind die prognostischen Auswirkungen dieses Tumortyps äußerst heterogen, da die Expression von PD-1 und seinen Liganden je nach Tumorlokalisation und -umgebung stark variiert [39, 62], wenngleich PD-L1 bei PECA der Kopf-Hals-Region unabhängig vom HPV-Status überexprimiert wird [36].

Der überwiegende Teil (fast drei Viertel) der hier eingeschossenen Patienten mit einem PECA des Kopf-Hals-Bereiches war männlich, was sich mit Angaben aus der Literatur deckt [13, 18]. Sehr wahrscheinlich ist dies zum einen damit zu begründen, dass Männer im Durchschnitt häufiger und eher höherprozentigen Alkohol konsumieren und zum anderen der Anteil rauchender Männer höher ist als der von Frauen [85, 86]. Ferner legen Studien nahe, dass HPV-Infektionen häufiger Männer als Frauen betreffen [87] und somit das Risiko für die Entwicklung eines HPV-positiven PECA bei Männern steigt. Eine Aussage darüber, ob das Geschlecht *per se* das Ausmaß der PD-L1-Expression beeinflusst, lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nicht ableiten.

Alkoholkonsum als einer der Risikofaktoren für die Pathogenese von PECA wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls dem Expressionsstatus von PD-L1 gegenübergestellt. Die retrospektiv ausgewerteten Daten zum Alkoholkonsum umfassten nach Angaben aus der Datenbank TuBa – sofern überhaupt vorhanden – die Kategorien „kein Alkoholkonsum“, „mäßiger Alkoholkonsum“ und „hoher Alkoholkonsum“. Die genaue Menge oder Art des regelmäßig zugeführten Alkohols konnte nicht genauer spezifiziert werden, da die Daten unter klinischen Aspekten und nicht unter Voraussetzungen für ein Studiendesign erhoben worden waren; eine genauere Klassifizierung im Nachgang war ebenfalls nicht möglich. Für 31 Patienten lagen keine Daten zum Alkoholkonsum vor; für die übrigen 48 Patienten waren Daten

erfasst. Von den 40 Personen, die Alkohol tranken wiesen 6 einen hohen und 32 einen mäßigen PD-L1-Expressionsstatus auf. Von den 8 Personen, die überhaupt keinen Alkohol konsumierten, zeigten alle 8 ein mindestens mäßiges PD-L1-Expressionsniveau. Von 17 Patienten, die einen hohen Alkoholkonsum hatten, wiesen je 2 einen negativen bzw. hohen PD-L1-Expressionsstatus auf; der überwiegende Teil zeigte ein mäßiges PD-L1-Expressionsniveau. Wie seit langem bekannt ist, sind PECA zwar überwiegend mit einem langjährigen bzw. hohen Alkoholkonsum assoziiert, dennoch zeigt sich nach aktueller Studienlage, dass immer mehr PECA - unabhängig vom Alkohol- und/ oder Tabakkonsum - auf der Grundlage einer HPV-Infektion entstehen [7, 12, 13, 61, 88]. Für die meisten HPV-positiven PECA lässt sich kein übermäßiger oder chronischer Alkoholkonsum eruieren [61]. Dies verdeutlicht, dass zwar eine Assoziation von PECA und Alkohol besteht, nicht jedoch von PD-L1-positiven PECA und Alkohol, da in die Gruppe der PD-L1-positiven PECA sowohl die Alkohol-assoziierten als auch die HPV-assoziierten Plattenepithelneoplasien fallen. Tabakkonsum gilt als ein weiterer Hauptrisikofaktor für die Entstehung von PECA im Kopf-Hals-Bereich. In der vorliegenden Arbeit konnte eine positive Assoziation zwischen Tabakkonsum und PD-L1-Positivität nachgewiesen werden. Die zugrunde gelegten Angaben zum Rauchverhalten, die in der Datenbank TuBa erfasst worden waren, unterschieden jedoch lediglich zwischen „Rauchern“ und „Nichtrauchern“. Eine genauere Diskriminierung, die eine quantitative Aussage zum Zigaretten- bzw. Tabakkonsum erlaubt hätte, war in der Datenbank TuBa nicht einheitlich erfasst worden, weshalb sich die Auswertung bezüglich des Merkmals „Tabakkonsum“ auf die Kategorien „Raucher“ und „Nichtraucher“ beschränkte. Angaben hierzu fanden sich in 59 von insgesamt 79 erfassten Fällen. Für 50 dieser Patienten war ein regelmäßiger aktiver Tabakkonsum bekannt. Für den weitaus größeren Teil davon (48 Fälle) konnte ein mäßiger oder sogar hoher PD-L1-Expressionsstatus nachgewiesen werden. Von dem weitaus kleineren Kollektiv der Nichtraucher, wiesen alle 9 Gewebeproben eine mäßige oder hohe PD-L1-Expression auf. Wenngleich auch in dem Kollektiv der Nichtraucher in allen Tumorproben eine PD-L1-Expression nachgewiesen werden konnte, scheint ein Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und PD-L1-Expression wahrscheinlich. Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass Rauchen möglicherweise durch lokale Veränderungen des Mikromilieus als Trigger für die PD-L1-Expression wirkt, wie auch bereits von anderen Autoren postuliert. Wie in einer Studie von *Rizvi et al.* gezeigt

werden konnte, induziert Rauchen eine erhöhte Mutationslast in Tumoren, was immunologische Epitope hervorbringen kann, die der Bekämpfung von Tumoren dienlich sein können. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass vermehrt PD-L1 vom Tumor exprimiert werden muss, damit dieser sich ausreichend vor der Zerstörung durch zytotoxische T-Zellen schützen kann [80]. Dieser Umstand kann durch Verwendung entsprechender Immuntherapeutika ausgenutzt werden; mit der Konsequenz eines besseren Ansprechens auf Immuntherapien bei Rauchern [89]. Der Grund, dass diese Hypothese in der vorliegenden Arbeit nicht hinreichend belegt werden konnte, liegt zum einen an dem kleinen Kollektiv der erfassten Nichtraucher, zum anderen sicher auch an der fehlenden Diskriminierung bezüglich der Quantität sowie des Zeitraums eines stattgehabten Tabakkonsums.

Unabhängig von der Tumorlokalisation wiesen 75 von 79 Patienten (das entspricht 94,9% des Gesamtkollektivs) einen mäßigen oder hohen PD-L1-Status auf; lediglich vier Gewebeproben wiesen einen negativen Expressionsstatus auf. Diese Tatsache könnte darin begründet sein, dass sowohl die Infektion mit HPV als auch der Tabakkonsum unabhängige PD-L1-Induktoren sind und bereits auf aerogenem Weg allen hier untersuchten Tumorlokalisationen im Kopf-Hals-Bereich zugänglich sind.

Bei dem hier untersuchten Kollektiv waren die meisten Tumoren im Bereich des Oropharynx lokalisiert; die wenigsten Tumoren fanden sich im Hypopharynx. Der prozentuale Anteil an PD-L1-exprimierenden Zellen war darüber hinaus am höchsten für Tumoren des Oropharynx und am geringsten für Tumoren des Hypopharynx. Hinsichtlich einer positiven Assoziation zwischen Tabakkonsum und PD-L1-Positivität ist es denkbar, dass der Oropharynx intensiver als die anderen untersuchten Lokalisationen mit volatilen Noxen in Kontakt kommt und die PD-L1-Expression damit verstärkt. Die Ergebnisse bzw. Häufigkeitsverteilungen decken sich mit denen von *Müller et al.* [90], wenngleich sich nach statistischer Testung der hier erhobenen Daten keine statistische Relevanz ergibt.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten malignen Biopsaten (aus Primärtumoren) exprimierte der weitaus größere Teil PD-L1. Von 58 untersuchten Primärtumoren zeigten 54 einen mäßigen oder hohen PD-L1-Expressionsstatus. Von den drei erfassten Lymphknotenmetastasen sowie von den untersuchten Lokalrezidiven wiesen alle einen mäßigen oder hohen Expressionsstatus auf. In Kontrast dazu zeigten 13 von 14 Zweittumoren lediglich eine negative PD-L1-Expression. Die hier

erhobenen Ergebnisse untermauern eine starke Assoziation zwischen PECA des Kopf-Hals-Bereiches und dem Ausmaß der PD-L1-Expression.

Die TNM-Klassifikation zum Staging maligner Tumoren unterteilt nach Schweregraden hinsichtlich der Ausdehnung (i.e. Größe und Infiltrationstiefe) des Primärtumors (T), des Lymphknotenbefalls (N) und etwaiger Metastasen (M).

Bezüglich der Ausdehnung des Primärtumors konnten zum Diagnosezeitpunkt 74,3% aller eingeschlossenen Fälle (55 von 74) als T1 oder T2 klassifiziert werden; die übrigen 25,7% (19 von 74 Proben) wurden zum Diagnosezeitpunkt als T3 oder T4 diagnostiziert. Von den 55 Proben die als T1 oder T2 klassifiziert wurden, wiesen 96,3% (53 von 55 Proben) einen mäßigen oder hohen PD-L1-Expressionsstatus auf. Von den 19 Proben, die als T3 oder T4 klassifiziert wurden, zeigten ebenfalls 94,7 % einen mäßigen oder gar hohen PD-L1-Expressionsstatus, sodass hier kein signifikanter Unterschied in der PD-L1-Expression in Assoziation mit der Ausdehnung des Primärtumors geschlussfolgert werden kann.

Von 68 Fällen, für die Angaben zur Lymphknotenmetastasierung vorlagen, zeigten 50 Lymphknotenmetastasen, was einem prozentualen Anteil von 73,5% entspricht. Von diesen 50 Fällen wiederum wiesen 90% einen mäßigen oder hohen PD-L1-Status auf. Dieser Anteil lässt zunächst einen Zusammenhang zwischen Ausmaß der PD-L1-Expression und der Lymphknotenmetastasierung vermuten; jedoch wiesen von den übrigen 18 Fällen ohne Lymphknotenmetastasierung ebenfalls 17 Gewebeproben einen mäßigen oder hohen PD-L1-Expressionsstatus auf, was einem Anteil von 94,4% entspricht. In 3 Fällen aller 68 eingeschlossenen Fälle wurde ein negativer PD-L1-Expressionsstatus erhoben. Immerhin war für zwei hiervon eine Lymphknotenmetastasierung dokumentiert. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass eine hohe PD-L1-Expression nicht zwingend mit einer höheren Lymphknotenmetastasierung assoziiert ist. Allerdings lässt sich dies aufgrund der geringen Stichprobengröße in der Kohorte mit fehlender Lymphknotenmetastasierung nicht stichhaltig belegen; eine größere Zahl inkludierter Fälle müsste zur Verifizierung dieser Annahme ausgewertet werden. Auch hinsichtlich einer Fernmetastasierung waren nicht für alle Patienten entsprechende Angaben in der Datenbank TuBa erfasst. Von 50 inkludierten Fällen waren 90% (i.e. 45 Patienten) zum Erfassungszeitraum frei von Fernmetastasen. Hiervon wiesen 82,2% ein mäßiges, 13,3% ein hohes und lediglich 4,4% ein negatives PD-L1-Expressionsniveau auf. Von den 5 Patienten, für

die eine positive Angabe zur Fernmetastasierung erfasst war, zeigten alle ein mäßiges PD-L1-Expressionsniveau in der zugehörigen Biopsie des Primarius. Diese Daten lassen vermuten, dass eine hohe PD-L1-Expression nicht mit einer höheren Fernmetastasierung assoziiert ist, jedoch ist auch in diesem Fall die geringe Stichprobengröße der erfassten Fälle mit Fernmetastasierung als mögliche Fehlerquelle anzuführen. Gleichwohl decken sich die hier erhobenen Ergebnisse und die daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen mit denen anderer Autoren [90]. PECA des Kopf-Hals-Bereiches metastasieren bevorzugt auf lymphogenem und erst sehr spät auf hämatogenem Weg. Eine hämatogene Metastasierung ist demnach zeitlich gesehen eher wahrscheinlich für Tumoren größeren Ausmaßes bzw. für Tumoren eines höheren Tumorstadiums. Der Fakt, dass die meisten der hier untersuchten Tumoren als ein T1-oder T2-Stadium eingestuft wurden und tendenziell mehr lymphogen als hämatogen streuen, untermauert diese Annahme. Ferner ist anzumerken, dass die TNM-Klassifikation der UICC vor dem Hintergrund einer Beurteilung der Tumoraggressivität und der klinischen Prognose als alleiniges Kriterium nur eingeschränkt herangezogen werden kann, da es sich hierbei nicht um eine histopathologische Charakterisierung des Tumors handelt. Die TNM-Klassifikation bringt das Problem mit sich, dass lediglich die anatomische Ausdehnung des Tumors erfasst wird. Wie in anderen Studien gezeigt werden konnte, beeinflusst aber gerade die molekulare Beschaffenheit von PECA der Kopf- und Halsregion – so schlussfolgernd auch das Expressionsniveau von PD-L1 – die Prognose [7].

Das Grading beurteilt den Differenzierungsgrad von Tumorgewebe und erlaubt unter Hinzuziehung der TNM-Klassifikation Entscheidungshilfe zu Therapiemöglichkeiten und Prognose einer Tumorerkrankung. Wie Abbildung 27 zu entnehmen ist, nimmt der relative Anteil der höchsten Stufe der PD-L1-Expression mit dem Grad der Entdifferenzierung zu und erreicht sein Maximum innerhalb der Gradingstufe G3 (G1: 0%; G2: 11,5%; G3: 25,0%). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass eine zunehmende PD-L1-Expression mit einer Entdifferenzierung von Tumoren vergesellschaftet ist. Im Kontrast hierzu konnte in einer Arbeit von *Müller et al.* jedoch keine Assoziation zwischen dem Ausmaß der PD-L1-Expression und dem Grad der Entdifferenzierung festgestellt werden [90]. Denkbar ist, dass auch in dieser Gegenüberstellung der beiden Parameter der Stichprobenumfang innerhalb der Grading-Stufen zu gering war und so zu einem statistischen Fehler zweiter Art führt.

Unterschiedliche Therapieregime können den Verlauf von Tumorerkrankungen wesentlich beeinflussen; daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine Assoziation zwischen der PD-L1-Expression und der durchgeführten Therapieform bestand. Da keiner der 74 Patienten, für die die Therapie bekannt war, eine neoadjuvante Therapie erhielt, lässt sich keine Aussage dazu treffen, ob diese die Ausprägung des PD-L1-Expressionsniveaus beeinflusst. Nichtsdestotrotz wäre es denkbar, dass das PD-L1-Expressionslevel aufgrund einer bestimmten biologischen Eigenart und deren klinischer Konsequenz signifikant bestimmte Therapieformen nach sich zieht. Wie Abbildung 28 zeigt, kann aufgrund der hier vorliegenden Daten jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der PD-L1-Expression und einer der o.g. Therapieregime angenommen werden.

Die R-Klassifikation ist ein Indikator für einen etwaig bestehenden Residualtumor nach Resektion. Unter der Annahme, dass aggressivere Tumoren schlechter resezierbar sind als solche mit geringerer Entdifferenzierung, wurde der R-Status mit der PD-L1-Expression korreliert. Hierbei ergab sich ein ähnliches Verteilungsmuster der PD-L1-Expression innerhalb der Gruppen R0, R1 und Rx, sodass sich diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des R-Status nachweisen ließen. Hinzu kommt, dass sowohl in der R0- als auch in der R1-Kohorte jeweils nur eine Probe und in der Rx-Kohorte lediglich 2 Fälle mit negativer PD-L1-Expression erfasst waren; sodass auch hier der Stichprobenumfang - zumindest der Kohorte „PD-L1 negativ“ deutlich größer sein müsste, um etwaige Unterschiede zwischen den Kohorten aufzuzeigen. Dieses gilt in gleicher Weise auch für den Parameter Tumorfreiheit.

Da es sich bei dieser Arbeit um eine retrospektive Analyse handelt, ließen sich bestimmte Parameter, wie z.B. die Festlegung von *Cut-off*-Levels zur genaueren Charakterisierung des Alkohol- oder Tabakkonsums, im Nachhinein nicht weiter modifizieren. Die in der TuBa hinterlegten Daten stammten letztlich aus den jeweiligen Patientenakten, deren Vollständigkeit gerade mit Blick auf die Therapieform oder z.B. den genauen Alkohol- und Tabakkonsum offenbleiben musste. Ebenso sind beispielsweise Fehler bei der Übertragung in die Datenbank nicht gänzlich auszuschließen, da die klinischen Daten von nur einer Person in die TuBa und somit ohne Zweitkontrolle übernommen wurden. Zwei weitere wichtige Aspekte bei der Beurteilung der erhobenen Ergebnisse sind die Anfertigung der Schnittpräparate und deren immunhistochemische Färbungen. Wie Studien nahelegen, scheint die Wahl der

Antikörper für die IHC eine nicht unerhebliche Rolle für die spätere Auswertung zu spielen, da die Anfärbung je nach verwendetem Antikörper variieren kann [91]. Darüber hinaus erfordert die Arbeit am Mikrotom einige Erfahrung, um gleichmäßige dünne Schnitte zu erzeugen und kann aus diesem Grund zu qualitativen Beeinträchtigungen für die spätere Auswertung führen. Die Qualität des Schnitts ist des Weiteren auch von der primären Sichtung des Gewebes abhängig, da sich hierbei entscheidet, welche Gewebeareale zur nachfolgenden TMA-Anfertigung markiert werden. Diese Markierung erfolgt jedoch manuell am Mikroskop. Die Schwierigkeit besteht durch die z.T. hohe (bis zur 40-fachen) Vergrößerung und dem Einzeichnen auf dem Objektträger bei einer insgesamt relativ kleinen Objektträgerfläche. Vor diesem Hintergrund wurden bei den doch sehr heterogenen PECA nekrotische oder stromareiche Areale teilweise miterfasst, dies u.a. auch dadurch bedingt, dass die Erzeugung der Schnitte am Mikrotom fortlaufend an einem Gewebeblock erfolgte. Die angewandte HALO®-Software hat gegenüber dem konventionellen Vorgehen am Mikroskop den Vorteil einer objektiven und reproduzierbaren Bildanalyse. Innerhalb des Programms müssen jedoch mehrere Feineinstellungen vorgenommen werden; was sich in Bezug auf die sehr heterogenen PECA der Kopf-Hals-Region z.T. als schwierig herausstellte. Dennoch zeigte sich in den stichprobenartigen Kontrollen (z.B. über Abgleich von Gewebeschnitt und erstellten Classifiern) eine hohe Übereinstimmung. Ein Qualitätsverlust durch Verwendung der digitalen Bildanalysesoftware konnte nicht beobachtet werden. Die Objektträger-Scans waren vollständig; die Farbunterschiede authentisch.

Wie diese Arbeit zeigt, exprimiert die überwiegende Mehrzahl von PECA des Kopf-Hals-Bereiches PD-L1 in irgendeiner Weise. Angesichts der Tatsache, dass die Gruppe mit negativer PD-L1-Expression anteilmäßig sehr klein ausfiel (4 von 79 Fällen entsprechend 5,1%), ist zu diskutieren, ob PECA des Kopf-Hals-Bereiches nicht grundsätzlich einer Immuntherapie mit Checkpointinhibitoren wie Pembrolizumab zugeführt werden sollten. In den Jahren 2014/ 2015 wurde Pembrolizumab als *First-Line*-Therapie zur Behandlung des malignen Melanoms etabliert; in den Jahren 2015/ 2016 zur Behandlung des NSCLC [65]. Die Keynote-012-Studie untersuchte als eine multizentrische Phase Ib-Studie die Sicherheit und Antitumoraktivität von Pembrolizumab bei Patienten mit rezidiviertem und/ oder metastasiertem PECA im Kopf-Hals-Bereich, bei welcher eine Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht des

monoklonalen Antikörpers im Intervall von zwei Wochen intravenös über einen Zeitraum von 24 Monaten appliziert wurden [36]. Wie sich in derselben Studie herausstellte, besitzt Pembrolizumab eine vielversprechende Antitumoraktivität bei einem insgesamt vertretbaren Nebenwirkungsprofil und es zeigte sich ein signifikant besseres Ansprechen von Patienten mit positivem PD-L1-Status. Der *Cut-off* für PD-L1-positiv wurde in der Keynote-012-Studie (wie auch in der vorliegenden Arbeit) bei $\geq 1\%$ festgelegt [36].

Im Hinblick darauf, dass der ganz überwiegende Teil an Patienten mit einem PECA des Kopf-Hals-Bereiches PD-L1 exprimiert, sollte diskutiert werden, ob nicht – bei einem insgesamt besseren Nebenwirkungsprofil gegenüber Zytostatika und/ oder Radiatio – grundsätzlich alle PECA o.g. Lokalisation einer Checkpoint-Inhibitor-Therapie zugeführt werden sollten; nicht zuletzt deshalb, weil sich in Studien auch eine Wirksamkeit von Immuntherapien bei einigen PD-L1-negativen Tumoren nachweisen ließ. Darüber hinaus ist die Erkrankung zum Diagnosezeitpunkt meist fortgeschritten und die gegenwärtigen Therapieoptionen sind bisher begrenzt. Der Großteil von PECA der Kopf-Hals-Region exprimiert PD-L1, was, wie sich in dieser Arbeit herausstellen ließ, die Überlebenszeit der betroffenen Patienten negativ beeinflusst. PD-L1 als eine Instanz innerhalb einer komplexen Signalkaskade lässt immense Auswirkungen auf die Funktionsweise unseres Immunsystems vermuten. Durch Blockade dieses Checkpoints scheinen viele weitere Rezeptoren, Liganden und Signalwege beeinflusst zu werden. Da sich durch Checkpoint-Inhibitoren, wie Pembrolizumab, Signalkaskaden positiv i.S. einer Tumorbekämpfung beeinflussen lassen und sich somit möglicherweise eine Verlängerung der Überlebenszeit erreichen lässt, sollte dies Anlass genug bieten, die Erkenntnisse auf diesem Gebiet weiter voranzutreiben. Weitere Studien sollten folgen, um die möglichen Einflussfaktoren auf den PD-1:PD-L1 Signalweg und sein begleitendes Entzündungsinfiltrat noch genauer zu beleuchten und diese Erkenntnisse für zukünftige Therapien nutzbar machen.

6. Literaturverzeichnis

1. W. Böcker HD, Ph. U. Heitz, H. Moch. Pathologie. 4. Auflage ed. München 2008. 167-98, 202-15, 602, 6, 66, 67, 1043, 4 p.
2. Afzali P, Ward BB. Management of the Neck in Oral Squamous Cell Carcinoma: Background, Classification, and Current Philosophy. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2019;31(1):69-84.
3. Pisani P, Airoldi M, Allais A, Aluffi Valletti P, Battista M, Benazzo M, et al. Metastatic disease in head & neck oncology. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2020;40(SUPPL. 1):S1-S86.
4. Mashberg A, Samit A. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1995;45(6):328-51.
5. Chen YJ, Chang JT, Liao CT, Wang HM, Yen TC, Chiu CC, et al. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer science*. 2008;99(8):1507-14.
6. Pare A, Joly A. [Oral cancer: Risk factors and management]. *Presse medicale (Paris, France : 1983)*. 2017;46(3):320-30.
7. Economopoulou P, de Bree R, Kotsantis I, Psyrris A. Diagnostic Tumor Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) in the Clinical Setting. *Frontiers in oncology*. 2019;9:827.
8. Scherubl H, von Lampe B, Faiss S, Daubler P, Bohlmann P, Plath T, et al. Screening for oesophageal neoplasia in patients with head and neck cancer. *British journal of cancer*. 2002;86(2):239-43.
9. Duprez F, Berwouts D, De Neve W, Bonte K, Boterberg T, Deron P, et al. Distant metastases in head and neck cancer. *Head & neck*. 2017;39(9):1733-43.
10. Canning M, Guo G, Yu M, Myint C, Groves MW, Byrd JK, et al. Heterogeneity of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Immune Landscape and Its Impact on Immunotherapy. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019;7:52.
11. Petruzzi MN, Cherubini K, Salum FG, de Figueiredo MA. Role of tumour-associated macrophages in oral squamous cells carcinoma progression: an update on current knowledge. *Diagnostic pathology*. 2017;12(1):32.
12. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(1):9-22.
13. Megwalu UC, Sirjani D, Devine EE. Oropharyngeal squamous cell carcinoma incidence and mortality trends in the United States, 1973-2013. *The Laryngoscope*. 2017.
14. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International journal of cancer*. 2007;121(11):2381-6.
15. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):37-49.
16. Maier H, Weidauer H. [Alcohol drinking and tobacco smoking are the chief risk factors for ENT tumors. Increased incidence of mouth cavity, pharyngeal and laryngeal carcinomas]. *Fortschritte der Medizin*. 1995;113(11):157-60.
17. Sieger MV, Batra, A., Mann, K. *Alkohol und Tabak : Grundlagen und Folgeerkrankungen* 1. Auflage ed 2011.

18. Lin K, Patel SG, Chu PY, Matsuo JM, Singh B, Wong RJ, et al. Second primary malignancy of the aerodigestive tract in patients treated for cancer of the oral cavity and larynx. *Head & neck*. 2005;27(12):1042-8.
19. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine*. 1995;332(11):712-7.
20. Peitzsch C, Nathansen J, Schniewind SI, Schwarz F, Dubrovskaja A. Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Identification, Characterization and Clinical Implications. *Cancers*. 2019;11(5).
21. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;363(1):24-35.
22. Hoffmann M, Kahn T, Mahnke CG, Goeroegh T, Lippert BM, Werner JA. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck determined by polymerase chain reaction and Southern blot hybridization: proposal for optimized diagnostic requirements. *Acta oto-laryngologica*. 1998;118(1):138-44.
23. Wang KH, Song BH, Gilde JE, Darbinian JA, Weintraub MLR, Wu TJ, et al. Diagnostic Pathway of Oral Cavity Cancer in an Integrated Health Care System. *The Permanente journal*. 2018;22:17-152.
24. Seliger B, Marincola FM, Ferrone S, Abken H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(12):550-9.
25. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2005;54(4):307-14.
26. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):252-64.
27. Montler R, Bell RB, Thalhofer C, Leidner R, Feng Z, Fox BA, et al. OX40, PD-1 and CTLA-4 are selectively expressed on tumor-infiltrating T cells in head and neck cancer. *Clinical & translational immunology*. 2016;5(4):e70.
28. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(19):12293-7.
29. Vasaturo† A. Clinical implications of co-inhibitory molecule expression in the tumor microenvironment for DC vaccination: a game of stop and go. 03.12.2013.
30. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;170(3):1257-66.
31. Malaspina TS, Gasparoto TH, Costa MR, de Melo EF, Jr., Ikoma MR, Damante JH, et al. Enhanced programmed death 1 (PD-1) and PD-1 ligand (PD-L1) expression in patients with actinic cheilitis and oral squamous cell carcinoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2011;60(7):965-74.
32. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-34.

33. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology*. 2008;26:677-704.
34. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*. 2001;2(3):261-8.
35. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends in molecular medicine*. 2015;21(1):24-33.
36. Chow LQM, Haddad R, Gupta S, Mahipal A, Mehra R, Tahara M, et al. Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(32):3838-45.
37. Dolled-Filhart M, Roach C, Toland G, Stanforth D, Jansson M, Lubiniecki GM, et al. Development of a Companion Diagnostic for Pembrolizumab in Non-Small Cell Lung Cancer Using Immunohistochemistry for Programmed Death Ligand-1. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2016.
38. Tirapu I, Huarte E, Guiducci C, Arina A, Zaratiegui M, Murillo O, et al. Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoescape mechanism of colon carcinoma. *Cancer research*. 2006;66(4):2442-50.
39. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 2003;63(19):6501-5.
40. Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1987;138(2):648-55.
41. Bakels V, van Oostveen JW, van der Putte SC, Meijer CJ, Willemze R. Immunophenotyping and gene rearrangement analysis provide additional criteria to differentiate between cutaneous T-cell lymphomas and pseudo-T-cell lymphomas. *The American journal of pathology*. 1997;150(6):1941-9.
42. Kitamura A, Yamashita Y, Hasegawa Y, Kojima H, Nagasawa T, Mori N. Primary lymphoma arising in the nasal cavity among Japanese. *Histopathology*. 2005;47(5):523-32.
43. de Ruiter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2017;6(11):e1356148.
44. Zhen A, Krutzik SR, Levin BR, Kasparian S, Zack JA, Kitchen SG. CD4 ligation on human blood monocytes triggers macrophage differentiation and enhances HIV infection. *J Virol*. 2014;88(17):9934-46.
45. Kisielow P. How does the immune system learn to distinguish between good and evil? The first definitive studies of T cell central tolerance and positive selection. *Immunogenetics*. 2019.
46. Wang RF. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends in immunology*. 2001;22(5):269-76.
47. Mechtersheimer G, Staudter M, Moller P. Expression of the natural killer (NK) cell-associated antigen CD56(Leu-19), which is identical to the 140-kDa isoform of N-CAM, in neural and skeletal muscle cells and tumors derived therefrom. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1992;650:311-6.

48. Zeromski J, Nyczak E, Dyszkiewicz W. Significance of cell adhesion molecules, CD56/NCAM in particular, in human tumor growth and spreading. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2001;39 Suppl 2:36-7.
49. Mechtersheimer G, Staudter M, Moller P. Expression of the natural killer cell-associated antigens CD56 and CD57 in human neural and striated muscle cells and in their tumors. *Cancer research*. 1991;51(4):1300-7.
50. Zhu LY, Zhou J, Liu YZ, Pan WD. [Prognostic significance of natural killer cell infiltration in hepatocellular carcinoma]. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer*. 2009;28(11):1198-202.
51. Kern WF, Spier CM, Miller TP, Grogan TM. NCAM (CD56)-positive malignant lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 1993;12(1-2):1-10.
52. Pulford KA, Rigney EM, Micklem KJ, Jones M, Stross WP, Gatter KC, et al. KP1: a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *Journal of clinical pathology*. 1989;42(4):414-21.
53. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2017;97(1):4-13.
54. Wang L, Zhang C, Zhang Z, Han B, Shen Z, Li L, et al. Specific clinical and immune features of CD68 in glioma via 1,024 samples. *Cancer management and research*. 2018;10:6409-19.
55. Alves AM, Diel LF, Lamers ML. Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2018;47(5):460-7.
56. Zhao X, Qu J, Sun Y, Wang J, Liu X, Wang F, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget*. 2017;8(18):30576-86.
57. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, McHugh J, Rozek L, Virani S, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2016;38(7):1074-84.
58. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):298-306.
59. Farnedi A, Rossi S, Bertani N, Gulli M, Silini EM, Mucignat MT, et al. Proteoglycan-based diversification of disease outcome in head and neck cancer patients identifies NG2/CSPG4 and syndecan-2 as unique relapse and overall survival predicting factors. *BMC cancer*. 2015;15:352.
60. Fonseca FP, Coletta RD, Azevedo MB, Prado Ribeiro AC, Pires Soubhia AM, Miyahara GI, et al. Stromal myofibroblasts in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients - a multicenter collaborative study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2014;118(4):483-9.
61. Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, Taube JM, Westra WH, Akpeng B, et al. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 2013;73(6):1733-41.
62. Zandberg DP, Strome SE. The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*. 2014;50(7):627-32.

63. Rettig EM, Zaidi M, Faraji F, Eisele DW, El Asmar M, Fung N, et al. Oropharyngeal cancer is no longer a disease of younger patients and the prognostic advantage of Human Papillomavirus is attenuated among older patients: Analysis of the National Cancer Database. *Oral oncology*. 2018;83:147-53.
64. Seiwert TY, Burtneß B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(7):956-65.
65. Khoja L, Butler MO, Kang SP, Ebbinghaus S, Joshua AM. Pembrolizumab. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2015;3:36.
66. Gillett CE, Springall RJ, Barnes DM, Hanby AM. Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study. *The Journal of pathology*. 2000;192(4):549-53.
67. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *The Journal of pathology*. 2001;195(1):72-9.
68. Fernebro E, Dictor M, Bendahl PO, Ferno M, Nilbert M. Evaluation of the tissue microarray technique for immunohistochemical analysis in rectal cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2002;126(6):702-5.
69. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000;80(12):1943-9.
70. Dhir R. Tissue microarrays: an overview. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2008;441:91-103.
71. Hutarew G. PD-L1 testing, fit for routine evaluation? From a pathologist's point of view. *Memo*. 2016;9(4):201-6.
72. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, Guerrero L, Waldroup S, Jaiswal D, et al. Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2019;143(3):330-7.
73. Coordes A, Ochsenreither S, Qian X, Hofmann VM, Meyer JE, Karl Hoffmann T, et al. [Immunotherapy Against Head and Neck Cancer Stem Cells]. *Laryngorhinootologie*. 2017;96(4):216-24.
74. Audrito V, Serra S, Stingi A, Orso F, Gaudino F, Bologna C, et al. PD-L1 up-regulation in melanoma increases disease aggressiveness and is mediated through miR-17-5p. *Oncotarget*. 2017;8(9):15894-911.
75. Uhlir DC. Was Pathologen über die Immuntherapie wissen sollten. 23.07.2017.
76. Schildhaus PDH-U. Der prädiktive Wert der PD-L1-Diagnostik. 01.11.2018.
77. Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, Abiko K, Baba T, Konishi I. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *Int J Clin Oncol*. 2016;21(3):462-73.
78. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;366(26):2443-54.
79. Kakavand H, Vilain RE, Wilmott JS, Burke H, Yearley JH, Thompson JF, et al. Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2015;28(12):1535-44.

80. Okada M, Shimizu K, Iyoda T, Ueda S, Shinga J, Mochizuki Y, et al. PD-L1 Expression Affects Neoantigen Presentation. *iScience*. 2020;23(6):101238.
81. Ruiter EJd. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. 09.08.2017.
82. Winkler JK, Bender C, Kratochwil C, Enk A, Hassel JC. PD-1 blockade: a therapeutic option for treatment of metastatic Merkel cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2017;176(1):216-9.
83. Zhao Q, Xiao X, Wu Y, Wei Y, Zhu LY, Zhou J, et al. Interleukin-17-educated monocytes suppress cytotoxic T-cell function through B7-H1 in hepatocellular carcinoma patients. *European journal of immunology*. 2011;41(8):2314-22.
84. Chen J, Li G, Meng H, Fan Y, Song Y, Wang S, et al. Upregulation of B7-H1 expression is associated with macrophage infiltration in hepatocellular carcinomas. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2012;61(1):101-8.
85. Erol A, Karpyak VM. Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: Contemporary knowledge and future research considerations. *Drug and alcohol dependence*. 2015;156:1-13.
86. Eisenbaum E, DiNitto DM, Bishop-Fitzpatrick L. Gender differences in tobacco use among U.S. Special Olympics athletes. *Disability and health journal*. 2018;11(3):466-70.
87. Adjei Boakye E, Buchanan P, Hinyard L, Osazuwa-Peters N, Schootman M, Piccirillo JF. Incidence and Risk of Second Primary Malignant Neoplasm After a First Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;144(8):727-37.
88. Kim HS, Lee JY, Lim SH, Park K, Sun JM, Ko YH, et al. Association Between PD-L1 and HPV Status and the Prognostic Value of PD-L1 in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res Treat*. 2016;48(2):527-36.
89. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348(6230):124-8.
90. Muller T, Braun M, Dietrich D, Aktekin S, Hoft S, Kristiansen G, et al. PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(32):52889-900.
91. Rehman JA. Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer. 11.11.2016.

Appendix

TNM-Klassifikation von Kopf-Hals-Tumoren 2017

Lippen und Mundhöhle (C02-C06):

- T1: Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung und 5 mm oder weniger maximale Infiltrationstiefe
- T2: Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung und mehr als 5 mm aber nicht mehr als 10 mm maximale Infiltrationstiefe
Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung und nicht mehr als 10 mm maximale Infiltrationstiefe
- T3: Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder maximale Invasionstiefe von mehr als 10 mm
- T4a: Tumor infiltriert durch kortikale Knochen der Maxilla oder Mandibula, in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
- N0: keine regionären Lymphknoten
- N1: Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung ohne extranodale Ausbreitung
- pN2a: Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3cm oder weniger in größter Ausdehnung mit extranodaler Ausbreitung oder mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- pN2b: Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keine mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- pN2c: Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keine mehr als 6cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- pN3a: Metastase(n) in solitären Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- pN3b: Metastase(n) in einem Lymphknoten mehr als 3 cm in größter Ausdehnung mit extranodaler Ausbreitung oder in multiplen ipsilateralen, kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten mit extranodaler Ausbreitung

M0: keine Fernmetastasen

M1: Fernmetastasen

Oropharynx (C01, C05.1, 2, C09.0, 1, 9, C10.0, 2, 3, 9):

(p16-negative Karzinome des Oropharynx, oder oropharyngeale Karzinome ohne Durchführung einer p16-Immunhistochemie)

Vorderwand (glossoepiglottische Region):

a) Zungengrund (hinter den Papillae circumvallatae oder hinteres Drittel) (C01)

b) Vallecula (C10.0)

Seitenwand (C10.2):

a) Tonsillen (C09.9)

b) Fossa tonsillaris (C09.0) und Gaumenbögen (C09.1)

c) Glossotonsillarfurche (C09.1)

Hinterwand (C10.3)

Obere Wand:

a) Orale Oberfläche des weichen Gaumens (C05.1)

b) Uvula (C05.2)

T1: Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung

T2: Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung

T3: Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis

T4a: Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer¹

¹ Schleimhautausbreitung zur laryngealen Oberfläche der Epiglottis von Primärtumoren der Zungenbasis und Vallecula gilt nicht als Invasion des Larynx.

-
- T4b: Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna
- N0: Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1: Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N2a: Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N2b: Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N2c: Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N3a: Metastase(n) in einem Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N3b: Metastase(n) in einem Lymphknoten mehr als 3 cm in größter Ausdehnung mit extranodaler Ausbreitung oder in multiplen ipsilateralen, kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten mit extranodaler Ausbreitung
- M0: keine Fernmetastasen
- M1: Fernmetastasen

Hypopharynx (C12, C13):

Pharyngoösophageale Grenze (Postkrikoidgegend) (C13.0):

Erstreckt sich von der Höhe der Aryknorpel mit Verbindungsfalten bis zum Unterrand des Ringknorpels und bildet die Vorderwand des Hypopharynx

Sinus piriformis (C12.9):

Erstreckt sich von der pharyngo-epiglottischen Falte bis zum oberen Ende des Ösophagus. Er wird seitlich vom Schildknorpel und medial von der hypopharyngealen Oberfläche der aryepiglottischen Falte (C13.1) sowie von Ary- und Ringknorpel begrenzt

Hypopharynxhinterwand (C13.2):

Erstreckt sich zwischen der Höhe des oberen Randes des Zungenbeines (oder des Bodens der Vallecula) bis zur Höhe des Unterrandes des Ringknorpels und vom Apex eines Sinus piriformis zum anderen.

- T1: Tumor auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt und/ oder 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- T2: Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Hypopharynx oder einen benachbarten Bezirk oder misst mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung, ohne Fixation des Hemilarynx
- T3: Tumor misst mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder Tumor mit Fixation des Hemilarynx oder Ausbreitung auf Ösophagusschleimhaut
- T4a: Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses²
- T4b: Tumor infiltriert prävertebrale Faszien, umschließt die A. carotis oder infiltriert Strukturen des Mediastinums
- N0: Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1: Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N2a: Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung mit extranodaler Ausbreitung oder mehr als 3 cm aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N2b: Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keine mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N2c: Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N3a: Metastase(n) in einem Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N3b: Metastase(n) in einem Lymphknoten mehr als 3 cm in größter Ausdehnung mit extranodaler Ausbreitung oder in multiplen ipsilateralen, kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten mit extranodaler Ausbreitung

² Die zentralen Weichteile des Halses schließen die gerade Halsmuskulatur und das subkutane Fett ein.

M0: keine Fernmetastasen

M1: Fernmetastasen

Nasopharynx (C11):

Dach und Hinterwand: beginnt auf Höhe des Übergangs zwischen hartem und weichem Gaumen und endet an der Schädelbasis (C11.0,1)

Seitenwand: schließt die Rosenmüller-Grube ein (C11.2)

Untere Wand: entsprechend der nasalen Fläche des weichen Gaumens (C11.3)

T1: Tumor auf den Nasopharynx begrenzt oder mit Ausbreitung auf den Oropharynx und/oder Nasenhöhle ohne parapharyngeale Invasion

T2: Tumor mit parapharyngealer Ausbreitung und/oder Invasion der medialen pterygoidalen, der lateralen pterygoidalen und/oder der prävertebralen Muskulatur

T3: Tumor infiltriert Knochenstrukturen der Schädelbasis oder Halswirbel, von Pterygoid-Strukturen und/oder Nasennebenhöhlen

T4: Tumor mit intrakranieller Ausbreitung und/oder Befall von Hirnnerv(en), Hypopharynx, Augenhöhle, Glandula parotis und/oder Invasion jenseits der lateralen Oberfläche der lateralen Musculi pterygoidei

N0: Keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1: Unilaterale Metastase(n) in Halslymphknoten und/ oder uni- oder bilaterale Metastase(n) in retropharyngealen Lymphknoten, 6 cm oder weniger in größter Ausdehnung, oberhalb der kaudalen Begrenzung des Krikoidknorpels

N2: Metastase(n) in bilateralen Lymphknoten, 6 cm oder weniger in größter Ausdehnung, oberhalb der kaudalen Begrenzung des Krikoidknorpels

N3: Metastase(n) in Lymphknoten, > 6 cm in größter Ausdehnung und/oder jenseits der kaudalen Begrenzung des Krikoidknorpels

M0: keine Fernmetastasen

M1: Fernmetastasen

Rastergesamtübersicht der TMA-Positionen

(a)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	Muskel	2888/0 5	4353/0 5 1,5,1	19865/ 05	20012/ 05 1,3	20067/0 5 1,3,2	20179/ 05	23671/ 05 1,4	26391/ 05 1,3	26391/ 05 2,5	32855/ 05 1,1	72505/ 05 SS	72884/ 05 SS2
B	Muskel	73667/0 5 SS 1,1	73810/ 05 SS	1526/0 6 2	3166/0 6	3507/0 6 1,4	4286/0 6 1,5	4691/0 6 2	5899/0 6 1	6187/0 6	6730/0 6	11792/ 06 1,6	11792/ 06 1,7
C		12135/ 06 1,8	12708/ 06 1,6	17431/ 06	17637/ 06	21636/ 06 1,8	24120/ 06 3	25406/ 06 1,1	26195/ 06 1,2	9299/0 7 1,5	13452/ 07	18886/ 07 1,1	18886/ 07 2,6
D		19173/ 07 1	19635/ 07 2,1	22470/ 07 2,2	23879/ 07 1,3	24584/0 7 1,14,1	24584/ 07 3,1	25623/ 07 3,7	25623/ 07 3,2	26139/ 07 1,5	26508/ 07 1,9	28436/ 07	31696/ 07 1
E	33136/0 71		34183/ 07 6,2	73401/ 07 SS	995/08 1,7	995/08 2,1	2469/0 8 1,13	3235/0 8 1,4	3399/0 8 1	5234/0 8 1,4	5234/0 8 2,1	10309/ 08 1	19284/ 08 1,3
F		22844/ 08 2,3	24059/ 08	27210/ 08 1,9	28057/ 08 1,1	30954/ 08 1,9	30954/ 08 2,1	31982/ 08	34926/ 08 2,2	35632/ 08 1,8	37825/ 08 2,4	38611/ 08 3,1	72740/ 08 SS
G		2031/0 9	4631/0 9 1,7	4631/0 9 3,1	4710/0 9 2,7	5984/0 9 1,5	7680/0 9	10631/ 09 1,8	11152/ 09 1,3	11152/ 09 2,1	12294/ 09 1,7	14256/ 09 3	14327/ 09 4,3
H		15540/ 09 3	18509/ 09 1,5	21777/ 09	27026/ 09 1,1	27887/ 09 1,2	32597/ 09	35424/ 09 1,3	35530/ 09 1,7	35946/ 09	36361/ 09 1,1	36563/ 09 1,5	37468/ 09
I		38275/ 09 1,7	70033/ 09 SS										

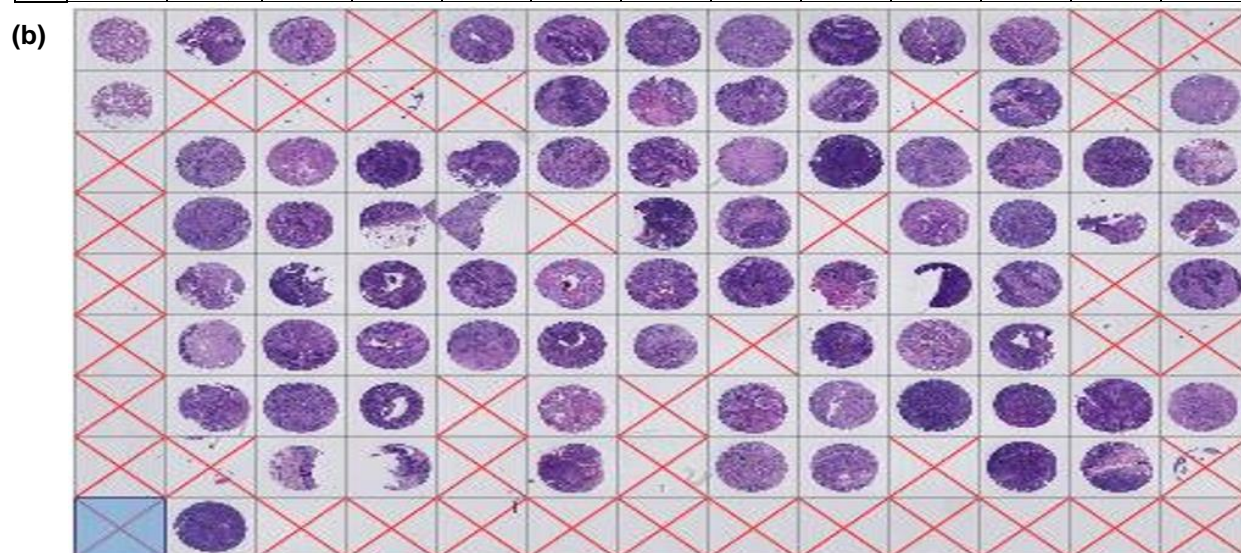


Abbildung 33: Rastergesamtübersicht der TMA-Positionierung.

(a): Schematische Anordnung der TMA-Paraffinblöcke.

(b): Beispielhafte Visualisierung der TMA. Erstellt mittels HALO®-Software.

Übersicht der 95%-Konfidenzintervalle für den Mittelwert

PD-1

	n	Mittelwert	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert	
			Untergrenze	Obergrenze
negativ	4	0,5931	-0,3083	1,4945
mäßig	62	5,2219	3,8310	6,6127
hoch	11	5,7067	1,8215	9,5920
Gesamt	77	5,0507	3,8154	6,2860

CD4

	n	Mittelwert	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert	
			Untergrenze	Obergrenze
negativ	4	3,8034	-5,5184	13,1252
mäßig	62	8,9688	6,0578	11,8798
hoch	10	8,6722	2,7936	14,5509
Gesamt	76	8,6579	6,1790	11,1368

CD8

	n	Mittelwert	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert	
			Untergrenze	Obergrenze
negativ	4	6,7321	-6,3415	19,8056
mäßig	61	20,9190	17,1605	24,6775
hoch	10	25,5182	14,3846	36,6518
Gesamt	75	20,7756	17,3589	24,1923

CD56

	n	Mittelwert	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert	
			Untergrenze	Obergrenze
negativ	4	3,4201	-0,1839	7,0240
mäßig	63	2,2090	0,1110	4,3071
hoch	9	0,7491	0,0331	1,4651
Gesamt	76	2,0999	0,3598	3,8400

CD68

	n	Mittelwert	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert	
			Untergrenze	Obergrenze
negativ	4	10,2114	4,5177	15,9052
mäßig	64	20,2242	17,364	23,0835
hoch	11	29,1545	18,3774	39,9317
Gesamt	79	20,9606	18,1706	23,7507

Beispielhafte ANOVA (hier für PDL-1 und Alter zum Diagnosezeitpunkt)

PDL-1 und Alter zum Diagnosezeitpunkt

	n	Mittelwert	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert	
			Untergrenze	Obergrenze
negativ	4	64,75	59,49	70,01
mäßig	64	62,36	59,57	65,15
hoch	11	60,27	53,29	67,25
Gesamt	79	62,19	59,78	64,60

Lebenslauf

Persönliche Daten

Juliane Constance Klöckl
geb. am 19.06.1989 in Schwerin

Ausbildung

Studium der Humanmedizin

November 2018 bis Dezember 2019 – Universität Rostock

April 2012 bis Oktober 2018 – Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Approbation als Ärztin am: 07. Januar 2020

Herbst 2019: Dritte Ärztliche Prüfung

Herbst 2018: Zweite Ärztliche Prüfung

Frühjahr 2015: Erste Ärztliche Prüfung

Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin

Februar 2009 bis Februar 2012 – Helios Kliniken Schwerin

Februar 2012: Examination

Schulausbildung

August 2000 bis Juli 2008 – Goethe Gymnasium Schwerin

Juni 2008: Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Berufstätigkeit

Weiterbildungsassistentin

seit Januar 2020 – Klinik für Dermatologie, Helios Kliniken Schwerin

Gesundheits- und Krankenpflegerin

November 2014 bis Januar 2017 – Klinik für Kardiologie der Universitätsklinik Mainz

Gesundheits- und Krankenpflegerin

Februar 2012 bis April 2012 – interdisziplinärer Bereich der Wahlleistungsstation, Helios Kliniken Schwerin

11.03.2021

Datum

Unterschrift

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Juliane Constance Klöckl, erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt, weder im In- noch im Ausland.

Überdies bin ich nicht im Besitz eines anderen Doktorgrades. Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Mir ist bekannt, dass die Zulassung zur Promotion zu versagen ist, wenn die Unterlagen unvollständig oder die Angaben unrichtig sind. Ich bin darüber informiert, dass ich zur Führung des Dokortitels erst mit Aushändigung der Promotionsurkunde berechtigt bin.

11.03.2021

Datum

Unterschrift

Danksagung

