
Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie – Plastische Operationen – der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**PD-L1-Expressionen bei oralen und
oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen –
Implikationen für mögliche immuntherapeutische
Ansätze**

Dissertationsschrift
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Constantin Rump
aus Bad Soden/Taunus

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 12. Juli 2022

Für meine Liebsten

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Allgemeines	Fehler! Textmarke nicht definiert.
1.2 Ziel der Arbeit.....	2
2 LITERATURDISKUSSION	3
2.1 Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich.....	3
2.1.1 Epidemiologie.....	8
2.1.2 Risikofaktoren	9
2.1.3 Präkanzerosen	10
2.2 Diagnose und Therapie	12
2.2.1 Diagnostische Verfahren	12
2.2.2 TNM-Klassifikation	13
2.2.3 Therapie des Plattenepithelkarzinoms	18
2.3 Tumor und Immunsystem.....	3
2.3.1 Ätiologie.....	3
2.3.2 Programmed death Ligand 1	5
3 MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 Material	21
3.1.1 Geräte.....	21
3.1.2 Reagenzien, Chemikalien	21
3.1.3 PD-L1 Antikörper	22
3.1.4 HPV p16-Antikörper.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.1.5 Software	22
3.2 Methoden	22
3.2.1 Patientenkollektiv	22
3.2.2 Gewinnung von Patientenmaterial	23
3.2.3 Konservierung von Patientenmaterial	23
3.2.4 Erstellung von Paraffinschnitten	23
3.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	23
3.2.6 Erstellung des TMA	24
3.2.7 Immunhistochemie	25

3.2.8	Auswertung mit der Halo Software	25
3.2.9	Auswertung der HPV-Expression.....	27
3.2.10	Statistische Methodik.....	27
4	ERGEBNISSE	29
4.1	Studienpopulation.....	29
4.2	OSCC und OPSCC.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.3	Risikoverhalten.....	30
4.4	TNM-Klassifikation, pathologische Eigenschaften	31
4.5	Resektionsstatus	33
4.6	HPV	34
4.7	PD-L1-Expression	34
4.7.1	Cologne Score	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.7.2	Histoscore	34
4.7.3	Epidemiologische Daten	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.7.4	OSCC und OPSCC	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.7.5	TNM-Klassifikation, pathologische Eigenschaften .	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.7.6	Resektionsstatus	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.7.7	HPV	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.8	Überleben	40
4.8.1	Eigenschaften des Kollektivs	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.8.2	OSCC und OPSCC	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.8.3	Risikoverhalten.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.8.4	TNM-Klassifikation, pathologische Eigenschaften .	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.8.5	Resektionsstatus	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.8.6	HPV	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.8.7	PD-L1-Expression	Fehler! Textmarke nicht definiert.
5	DISKUSSION.....	48
5.1	Das Kollektiv	48
5.2	Material und Methoden	52
5.3	Scoringsysteme und Grenzwerte	53
5.4	PD-L1 als prognostischer Marker.....	57
5.5	PD-L1 als Angriffspunkt der Tumorthherapie	58

Inhaltsverzeichnis

5.6	OPSCC und OSCC im Vergleich	60
5.7	PD-L1 und HPV	63
6	ZUSAMMENFASSUNG	66
7	LITERATURVERZEICHNIS	67
8	ANHANG	82
8.1	Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8.2	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8.3	Tabellarischer Lebenslauf	84

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
CPS	combined positivity score
CT	Computertomographie
DFS	disease free survival
ENE	extranodal extension
HIF-1 α	Hypoxie induzierter Faktor 1 α
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papilloma Virus
IHC	Immunhistochemie
ISH	In situ Hybridisierung
IL	Interleukin
ITSM	Immunoreceptor tyrosine-based switch motif
JÜR	Jahres-Überlebensrate
MRT	Magnetresonanztomographie
NSCLC	Non squamous cell lung cancer
OPSCC	oropharyngeal squamous cell carcinoma
OS	overall survival
OSCC	oral squamous cell carcinoma
OSF	orale submuköse Fibrose
p16	Protein 16
p53	Protein 53
PD-1	Programmed death receptor-1
PD-L1	Programm death ligand-1
PECA	Plattenepithelkarzinom
PET-CT	Positronenemissionstomographie-Computertomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Rb	Retinoblastom-Protein
ROC	receiver operating characteristic

Abkürzungsverzeichnis

SCC	squamous cell carcinoma
SD	Standardabweichung
SHP-1	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
SHP-2	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2
TPS	Tumor Proportion Score
TMA	Tissue microarray
UICC	Union international contre le cancer
vs.	versus
ZAP	zeta-chain-associated protein kinase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hallmarks of cancer. Modifiziert nach Hanahan et al. (33)

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise der PD-1/PD-L1-Achse an B- und T-Zellen. Modifiziert nach Lenouvel et al. (53)

Abbildung 3: Klinische Manifestation eines oralen Plattenepithelkarzinoms des linken Zungenrandes. Foto aus der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsmedizin Mainz

Abbildung 4: Darstellung eines gesamten TMAs mittels NDP.view2

Abbildung 5: Darstellung der Arbeitsschritte des Halo Programms

Abbildung 6: Grafik der Altersverteilung bei Diagnosestellung im Gesamtkollektiv

Abbildung 7: Lokalisationsverteilung der Tumore innerhalb der beiden untersuchten Entitäten OSCC und OPSCC

Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der T-Stadien innerhalb der jeweiligen Entität

Abbildung 9: Darstellung der Häufigkeiten des Lymphknotenstatus innerhalb des Gesamtkollektivs.

Abbildung 10: Verteilung des Gradings aufgeteilt nach OSCC und OPSCC

Abbildung 11: Darstellung der Häufigkeiten des TPS bei Betrachtung des Kollektivs

Abbildung 12: Darstellung der prozentualen Verteilung des Cologne Scores

Abbildung 13: Boxplots von OSCC und OPSCC über die Verteilung des TPS

Abbildung 14: Boxplots von OSCC und OPSCC über die Verteilung des Histoscores

Abbildung 15: Darstellung der Überlebenskurve nach Altersgruppen

Abbildung 16: Darstellung der Überlebenskurve für OSCC und OPSCC

Abbildung 17: Darstellung der Überlebenskurve für T1/2 und T3/4

Abbildung 18: Darstellung der Überlebenskurve für N0 und N+

Abbildung 19: Darstellung der Überlebenskurve für R0 und R1

Abbildung 20: Darstellung der Überlebenskurve für p16+ und p16-

Abbildung 21: Darstellung der Überlebenskurve für PD-L1-positive und -negative Tumore anhand eines cut-offs von einem TPS $\geq 50\%$

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vereinfachte Darstellung der TNM Klassifikation (7. und 8. Auflage) für OSCC. Modifiziert nach nach Bradish et al. 2020 und der TNM Klassifikation (8. Auflage) für OSCC modifiziert nach der aktualisierten S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom 2021

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht der Tumorstadien nach UICC beim OSCC modifiziert nach der S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom Version 2.0, Leitlinienprogramm Onkologie 2012 und der aktualisierten S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom Langversion 3.0. Leitlinienprogramm Onkologie. 2021

Tabelle 3: Vergleich der TNM-Klassifikationen 7. Auflage modifiziert nach: Pan JJ, Ng WT, Zong JF, Chan LL, O'Sullivan B, Lin SJ, et al. Proposal for the 8th edition of the AJCC/UICC staging system for nasopharyngeal cancer in the era of intensity-modulated radiotherapy. Cancer. 2016;122(4):546-58 und der 8. Auflage für HPV-positive OPSCC modifiziert nach: Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 2017;67(2):122-37

Tabelle 4: Übersicht der Tumorstadien nach UICC für OPSCC nach TNM (7. Aufl.) modifiziert nach Pan JJ, Ng WT, Zong JF, Chan LL, O'Sullivan B, Lin SJ, et al. Proposal for the 8th edition of the AJCC/UICC staging system for nasopharyngeal cancer in the era of intensity-modulated radiotherapy. Cancer. 2016;122(4):546-58 für HPV-positive OPSCC modifiziert nach Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 2017;67(2):122-37

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

1.1 Einleitung

Bösartige Tumore sind für einen immer größer werdenden Anteil der krankheitsbedingten Todesfälle verantwortlich (1). Jährlich erkranken weltweit rund 18 Millionen Menschen neu an Krebs. 9,5 Millionen sterben auf Grund eines Tumors (2). Laut den aktuellen Daten des World Cancer Reports 2020 sind Krebserkrankungen in den Industrienationen die häufigste Ursache für vorzeitige Todesfälle (3).

Tumore des Kopf-Hals-Bereichs nehmen 3,6% weltweit (1) und in Deutschland ca. 2,7% der Krebserkrankungen ein (4). Von diesen sind über 90% Plattenepithelkarzinome (PECA) (5). Die kann man in orale (OSCC) und oropharyngeale Plattenepithelkarzinome (OPSCC) unterteilen.

Ein Großteil dieser Tumore sind mit den „klassischen“ Risikofaktoren, wie Rauchen und übermäßigem Alkoholkonsum, assoziiert (6). In diesem Zusammenhang konnten in den letzten Jahren diskret sinkende Fallzahlen beobachtet werden. Die Ursache hierfür ist der signifikante Rückgang der Personen, die täglich Tabak rauchen (7). Dementgegen steigt die Zahl der mit Humanen Papillomaviren (HPV) assoziierten Tumore, vornehmlich bei OPSCC (8).

Die Diagnose eines PECA im Kopf-Hals-Bereich stellt für einen Großteil der Patienten eine fatale Prognose dar. Die 5-Jahres-Überlebensrate (JÜR) für behandelte Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) liegt in Abhängigkeit der Tumorgöße und -ausbreitung zwischen 35-50% (9, 10). Für viele Betroffene kann mit den zur Verfügung stehenden Behandlungsmöglichkeiten bisher keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit erzielt werden. Aktuell stellt die chirurgische Intervention die am häufigsten angewandte Therapieoption und den Goldstandard dar (11). Vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien wird eine adjuvante Therapie mittels Bestrahlung und/oder Chemotherapie notwendig (12, 13). In der Vergangenheit wurden weitere Interventionen wie die laserbasierte Mikrochirurgie oder intensitätsmodulierte Bestrahlungskonzepte etabliert. Diese neuartigen Optionen erbrachten in der Zusammenschau jedoch keinen zufriedenstellenden Anstieg der 5-JÜR (14, 15).

In den letzten Jahren sind vermehrt Medikamente der zielgerichteten Antikörpertherapie auf den Markt gekommen. Diese greifen spezifisch Signalkaskaden an, die das Tumorwachstum beeinflussen oder die Immunreaktion des Körpers regulieren. Sie eröffnen neue Behandlungsperspektiven für solide Tumore wie OSCC und OPSCC.

Einen dieser Signalwege stellt der programmed death rezeptor 1 (PD-1) mit seinem entsprechenden Liganden, dem programmed death ligand 1 (PD-L1), dar. Er hat eine regulierende Funktion auf die Immunantwort im menschlichen Organismus (16).

In vielen Tumorentitäten ist PD-L1 bereits nachgewiesen worden (17). Dies führte zur Entwicklung spezifischer Antikörper mit diesem Angriffspunkt (18). In manchen Entitäten wurden durch den Einsatz dieser zielgerichteten Therapie bereits vielversprechende Erfolge erzielt. Beim NSCLC (non small cell lung cancer) konnte durch den Einsatz eines programmed death rezeptor 1-(PD-1) Antikörpers die 1-JÜR von 24%, bei herkömmlicher Chemotherapie, auf 41%, gebessert werden (19). Dies deutet an, welches Potential die zielgerichtete Therapie mit PD-L1 haben kann.

1.2 Ziel der Dissertation

In der Studienlandschaft wird häufig nicht konkret zwischen oralen und oropharyngealen PECA unterschieden. Jedoch zeigt beispielsweise der Zusammenhang mit HPV, dass es deutliche Unterschiede in der Genese und der Prognose zwischen den Entitäten gibt. Daher ist es auch auf dem Gebiet der zielgerichteten Antikörpertherapie wichtig OSCC und OPSCC getrennt zu beleuchten, um Differenzen feststellen zu können.

Ziel dieser Vergleichsstudie ist es, die Rolle der PD-L1-Expression bei oralen und oropharyngealen Tumoren zu analysieren und mögliche Unterschiede der PD-L1-Expression bei den entsprechenden Entitäten herauszuarbeiten. Es wird analysiert, ob quantitative und qualitative Unterschiede zwischen OSCC und OPSCC bezüglich der Expression von PD-L1 bestehen. Es wird zudem untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und einer Infektion mit HPV gibt.

Des Weiteren wird untersucht, ob eine Korrelation zwischen PD-L1-Expression und Malignität des Tumors besteht. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der TNM-Klassifikation, dem Gesamtüberleben (OS) und dem erkrankungsfreien Überleben (DFS).

In Hinblick auf eine zielgerichtete Antikörpertherapie soll evaluiert werden, ob PD-L1-Positivität der jeweiligen Entität als Anzeichen für eine bessere oder schlechtere Prognose gewertet werden kann. Bereits entwickelte Medikamente, wie Nivolumab oder Atezolizumab, die an dieser Achse angreifen könnten in der Therapie des fortgeschrittenen und nicht mehr chirurgisch kurativ therapierbaren OSCC und OPSCC verstärkt eingesetzt werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Tumor und Immunsystem

2.1.1 Ätiologie

Tumorerkrankungen sind für einen jährlich wachsenden Anteil der Todesfälle weltweit die Ursache (1). Besonders in den weit entwickelten Industrienationen ist in den kommenden Jahren eine wachsende Zahl an behandlungswürdigen Tumoren zu erwarten (20). Folglich ist es von entscheidender Bedeutung die Genese und das Verhalten von Tumoren umfassend zu verstehen.

Die Entstehung eines Tumors stellt ein komplexes Geschehen dar, an dem mehrere Faktoren beteiligt sind. Das Zusammenspiel einer Schädigung des Zellgenoms und unzureichender Reparaturmechanismen ist die Grundlage für die Entstehung einer Tumorzelle (21). Diese Schädigung kann durch Noxen wie UV-Licht, Alkohol und Tabakrauch oder durch Mutationen im Genom einer Zelle entstehen (22). Eine Infektion kann ebenfalls ursächlich für eine Mutation einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle sein. Für die Entstehung von OSCC und OPSCC stellt eine Infektion mit HPV einen der Hauptrisikofaktoren dar (s. 2.2.2). Hervorzuheben sind dabei besonders die high-risk Virustypen HPV 16 und HPV 18 (23). Für den Ursprung der Tumorgenese im Zusammenhang mit einer HPV-Infektion wird die verstärkte Expression der Onkoproteine E6 und E7 angenommen (24). Im Rahmen einer viralen Infektion kann es zu einer induzierten Freisetzung von E6 und E7 kommen. Diese inaktivieren die Proteine Protein p53 (p53) und das Retinoblastom-Protein (Rb).

P53 ist an der Kontrolle von Wachstum, Zyklus und Überleben von Zellen beteiligt. Liegt eine Mutation oder eine Inaktivierung von p53 vor, kann eine unregelmäßige Zellproliferation möglich werden und ein Tumor entstehen (24, 25). Die Beteiligung von p53 an unkontrolliertem Tumorstadium wurde in Studien bereits für diverse Tumorentitäten nachgewiesen (26, 27). In rund der Hälfte aller Tumore liegt ein mutiertes p53 vor. Die Art der Mutation variiert dabei (28). In Studien wurde beobachtet, dass bei HPV-positiven HNSCC seltener eine Mutation von p53 vorliegt (29). Die virale Infektion, als auch die Mutation können unabhängig voneinander zu einer Inaktivierung der Proteinfunktion führen (30). Bereits im Jahr 1995 beschrieb Hanahan, dass Rb einen wichtigen Einfluss auf die Zelltransduktion ausübt. Bei Funktionsverlust, beispielsweise durch Mutation oder Inaktivierung, fehlt in der Zellvermehrung ein bedeutender, hemmender Faktor. Dadurch kann es zur unkontrollierten, tumortypischen Zellvermehrung kommen (31).

2.1.2 Immunescape

Neben der Entstehung einer Krebszelle ist der Erhalt und die Proliferation für den Tumor von entscheidender Bedeutung. Damit Tumorzellen wachsen und sich vermehren können, müssen sie sich dem Immunsystem erwehren. Dazu sind Tumorzellen in der Lage auf unterschiedlichen Wegen der körpereigenen Abwehr zu entgehen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Immunescape (32). In ihrer grundlegenden Arbeit aus dem Jahre 2000 postulierten Hanahan und Weinberg sechs Faktoren, die eine Krebszelle von einer normalen Zelle unterscheiden (33). Diese Kennzeichen einer Tumorzelle sind Vermeidung der Apoptose, Eigenversorgung mit Wachstumsfaktoren, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, dauerhafte Angiogenese, Infiltration von Gewebe mit Streuung von Tumorzellen, sowie unendliches Potential zur Replikation. All diese Faktoren begünstigen einen Überlebensvorteil für die Krebszellen. In ihrer ergänzenden Arbeit von 2011 werden vier weitere Eigenschaften von Tumorzellen formuliert. Sie nennen das Ausweichen vor der körpereigenen Immunantwort, eine Veränderung der Stoffwechselprozesse durch den Tumor, sowie die Entwicklung von willkürlichen Mutationen durch Instabilität des Genoms und eine dauerhafte, tumorfördernde Entzündungsreaktion als Kennzeichen.

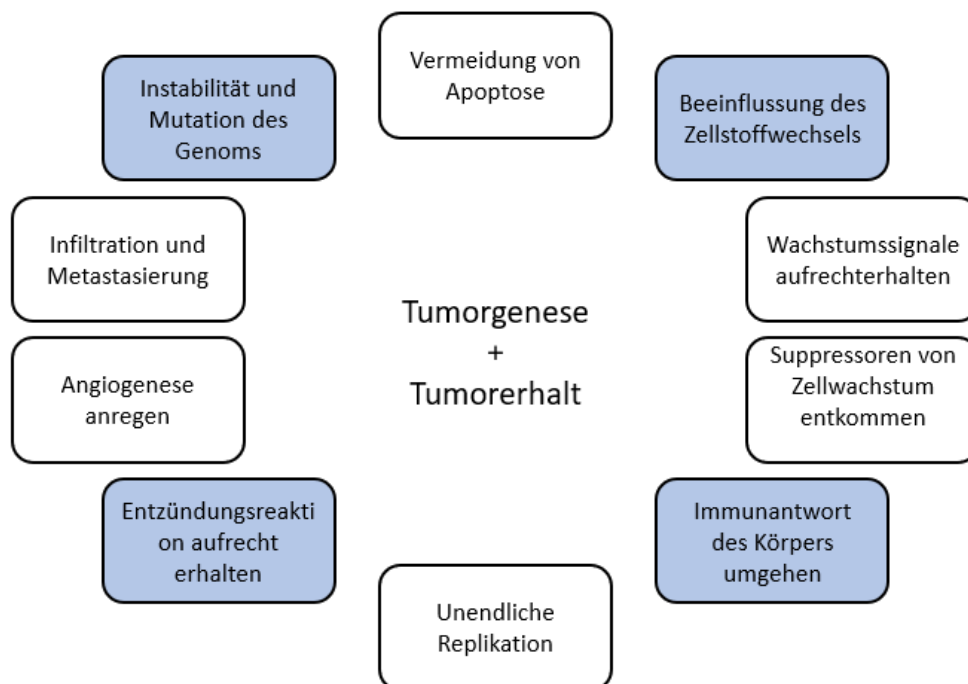


Abbildung 1: Das Diagramm zeigt die Einflussfaktoren, durch die Entstehung und das Wachstum eines Tumors ermöglicht werden. Weiß hinterlegt sind die 6 Faktoren, die bereits im Jahr 2000 genannt wurden. Blau hinterlegt sind die im Jahr 2011 ergänzten

Faktoren. Grafik modifiziert nach Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74 (34)

Zur Entstehung eines Tumors sind nicht alle Faktoren notwendig. Auch eine zeitliche Abhängigkeit untereinander besteht, laut Hanahan und Weinberg, nicht (34). Einen Weg, den manche Tumorzellen zum Immunescape nutzen, ist die Achse von PD-1 und PD-L1 (35).

2.1.3 Programmed death Ligand-1

Ein neuer Fokus in der Tumorthherapie liegt auf dem Einsatz von so genannten Checkpoint-Inhibitoren. Checkpoints sind Schaltstellen der körpereigenen Immunantwort. Über ausgeschüttete Botenstoffe oder Zell-Zell-Kontakte kann eine Modulation von Immunzellen gesteuert werden. Die Achsen regulieren die Aktivität der T-Zellen und schützen den Körper vor überschießender Immunantwort. Dieser Weg hilft den Tumoren eine chronische Entzündungsreaktion aufrecht zu erhalten (16).

Die PD-1/PD-L1 Achse stellt einen solchen Checkpoint dar. 1992 entdeckten Ishida et al. das membranständige Rezeptorprotein PD-1 an murinen T-Zellen im Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod (36). PD-1 wird auf B-, T- und Myeloidzellen exprimiert (37).

Das Glykoprotein PD-L1 (auch B7-H1, cluster of differentiation (CD)274 genannt) wurde 1999 von Dong et al. entdeckt (35, 38). PD-L1 besteht aus 290 Aminosäuren und hat eine interzelluläre und transmembranäre Domäne. Es wird auf dem Chromosom 9 des Menschen codiert (37). PD-L1 ist ein Mitglied der sogenannten "B7-Familie". Eine Gruppe von Membranproteinen, die sich auf Antigenpräsentierenden Zellen (APC) befinden und mit T-Zellen interagieren. PD-L1 wurde auf Zellen der Hämatopoese, B-Zellen, T-Zellen, Dendritischen Zellen und Makrophagen gefunden (39). PD-L1 kommt ebenfalls auf Endothelzellen der Gefäße, Myokardzellen und in den Inseln des Pankreas vor (40). Eine hohe Expression zeigte sich in den Tonsillen, der Lunge und im Synzytiotrophoblast der Plazenta. Auch in Tumorzellen konnte PD-L1 nachgewiesen werden. Die entarteten Zellen exprimierten PD-L1 sowohl auf der Plasmamembran als auch im Zytosol (18). Tumorentitäten, die bisher mit einer verstärkten PD-L1-Expression in Verbindung gebracht werden konnten, sind unter anderem NSCLC, HNSCC, Nierenzellkarzinome, Hodgkin-Lymphome, Urothelkarzinome und Melanome (17, 41).

Im Jahr 2001 zeigten Latchmann et al., dass mit PD-L2 (auch: B7-DC; CD273) ein zweiter Ligand für PD-1 existiert. Ähnlich zu PD-L1 wurde PD-L2 ebenfalls auf vielen verschiedenen Zellen des Immunsystems nachgewiesen (42).

2.1.3.1 Wirkungsweise von PD-L1 und Rolle in der Tumorgenese

Der Checkpoint PD-1/PD-L1 hat eine regulierende Funktion in der Immunantwort des Körpers inne. Bei einer Bindung von PD-1 und PD-L1 tritt eine Abfolge biochemischer Signaltransduktionen in Kraft. Die Signalkaskade nimmt in B- und T-Zellen einen unterschiedlichen Verlauf.

Zu Beginn führt die Bindung von PD-1 in der B- und T-Zell-Reihe zu einer Phosphorylierung des Tyrosinrestes der ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif). Dieser phosphorylierte Rest aktiviert SHP-1 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1) und SHP-2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2), wobei die Wirkung von SHP-1 als vernachlässigbar angesehen wird. In der B-Zell-Reihe dephosphoryliert SHP-2 das dem B-Zell-Rezeptor nachgeschaltete Signalmolekül Syk. Dadurch wird die Signalkaskade der B-Zelle gestoppt. Als Folge dessen kommt es zu einer verminderten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. In T-Zellen dephosphoryliert SHP-2 die Moleküle PI3K und/oder ZAP (zeta-chain-associated protein kinase)-70. Dadurch wird die nachfolgende Signalkaskade in der T-Zelle gestoppt. Die Hemmung von PI3K bewirkt zudem eine gedrosselte Produktion des Peptidhormons Interleukin (IL)-2 (43, 44). Durch die Bindung von PD-L1 und dem co-stimulierenden Ligand CD80 wird die T-Zell-Wirkung weiter eingeschränkt (45).

Durch diese hemmende Wirkung auf B- und T-Zellen wirkt der PD-1/PD-L1-Signalweg regulierend auf Immunreaktionen in Gewebe und Organen (46). So wird der Körper auch von überschießenden (Auto-)Immunreaktionen geschützt. Im Synzytiotrophoblast der Plazenta wird PD-L1 in erhöhtem Maß exprimiert. Dadurch wird eine Abstoßungsreaktion des maternalen Körpers auf fetale Zellen verhindert (47). Ähnliche Einflüsse wurden auch bei Organtransplantationen beschrieben (48).

Eine Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen bewirkt eine erhöhte Expressionsrate von PD-L1 an der Zelloberfläche (49). In Zellkulturen wurde beobachtet, dass proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ und IL-10 die PD-L1-Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen steigern (50). Auch der bei Zellstress freigesetzte Mediator HIF-1 α (Hypoxie induzierter Faktor 1 α) scheint das Vorkommen von PD-L1 zu steigern (51). Diese erhöhte Expression bewirkt eine Steigerung der Apoptose von T-Zell-Klonen

(18). In manchen Studien stellt Interferon- γ den einflussreichsten Faktor für die gesteigerte PD-L1-Expression dar (52).

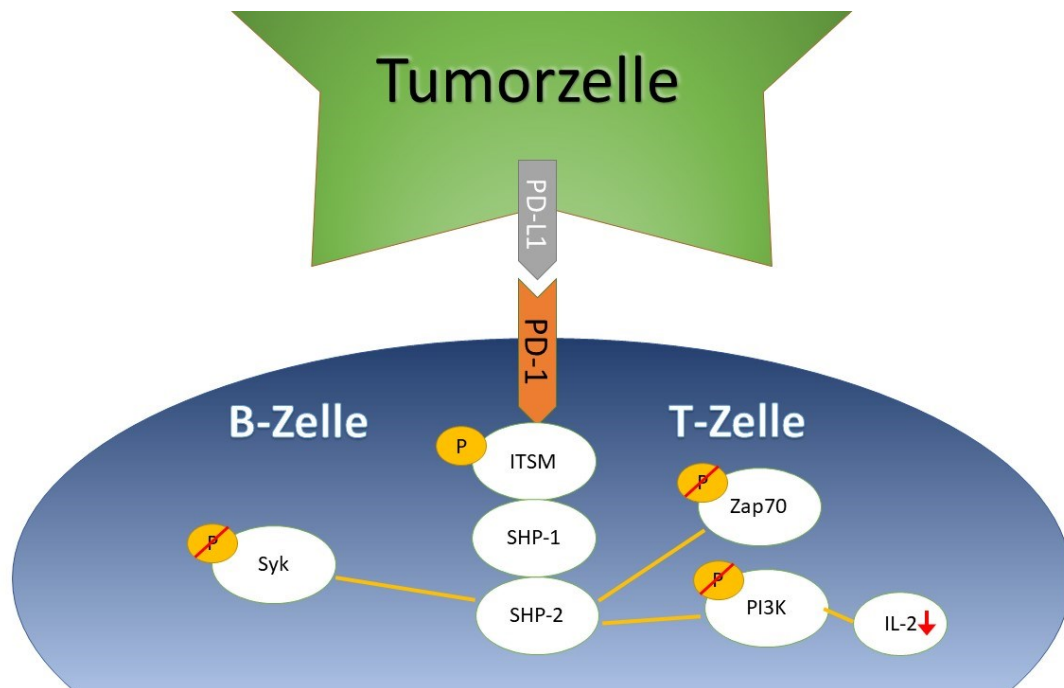


Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung der Funktionsweise der PD-1/PD-L1-Achse an B- und T-Zellen. Durch Bindung von PD-L1 an den Rezeptor PD-1 wird eine Signalkaskade angestoßen. ITSM wird phosphoryliert und aktiviert SHP-1 und SHP-2. SHP-2 bewirkt in B-Zellen eine Dephosphorylierung von Syk. Als Folge dessen kommt es zu einer Hemmung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren. SHP-2 hemmt die Wirkung von ZAP-70 und PI3K durch Dephosphorylierung. Dies führt zu einer verminderten Immunreaktion und geringeren Ausschüttung von IL-2. Modifiziert nach Lenouvel et al. 2020 (53).

Tumorzellen manipulieren die PD-1/PD-L1-Achse. Durch Tumorinduktion überexprimierte PD-L1 treiben tumorspezifische T-Zellen in die Apoptose. So wird die Tumorzelle resistent gegen die körpereigenen Immunstrategien. Dieser Weg beschreibt den Immunescape einer Tumorzelle über PD-1 und PD-L1 (18). Der PD-L1-Signalweg hemmt zudem am T-Zell-Rezeptor (TCR) eine durch CD3/CD28 ausgelöste Immunantwort (37).

Die Wirkweise von PD-L1 und PD-L2 gleicht sich zu großen Teilen. Als ein entscheidender Unterschied wird die Tatsache angesehen, dass PD-L1 auch an das Oberflächenprotein CD80 binden kann, welches als Co-Stimulator der T-Zellen dient (54).

2.2 Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich

2.2.1 Epidemiologie

Tumorerkrankungen der Mundhöhle sind weltweit für über 300.000 Neuerkrankungen und rund 150.000 Todesfälle jährlich verantwortlich (1). Rund 90% dieser Krebserkrankungen der Mundhöhle sind Plattenepithelkarzinome (55). In Südostasien, Zentral- und Osteuropa treten die meisten Tumore dieser Entität auf (1, 56). Die Tendenz der letzten Jahrzehnte ist regional unterschiedlich. Die Zahlen bei Männern in West- und Südeuropa, sowie bei Männern und Frauen in Asien, Australien und Nordamerika sind deutlich rückläufig. Dem gegenüber gab es einen Anstieg in Ost- und Nordeuropa sowie bei Frauen in Süd- und Westeuropa. Ein Faktor für diese Entwicklung sind die sich wandelnden Rauchgewohnheiten der Gesellschaften (57).

In der hier vorliegenden Studie wurde anhand der OP-Berichte und histopathologischen Auswertungen eine anatomische Einteilung in oral und oropharyngeal vorgenommen. Zu oralen Tumoren wurden folgende Lokalisationen gezählt: Zunge und die Schleimhaut von Oberkiefer, Unterkiefer, Wange und des Mundbodens. Für die oropharyngealen Tumore wurde in Zungengrund, weicher Gaumen und Uvula, Tonsilla palatina und distaler Oropharynx (mit Rachenhinterwand) unterschieden. In den veröffentlichten Studien, die aus der Literatur extrahiert wurden, konnten die Begriffe HNSCC, OSCC, OPSCC, oral cavity, pharynx, hypopharynx nicht eindeutig differenziert gefunden werden, sodass eine scharfe Abgrenzung schwierig war. Im World Cancer Report werden die oralen Tumore in Lippe, vordere zwei Drittel der Zunge, harter Gaumen, Wangenschleimhaut, Zahnfleisch und Mundboden unterteilt. Für den Oropharynx werden weicher Gaumen, Uvula, Zungengrund, Rachenwand, Tonsillen unterschieden. Der Hypopharynx stellt innerhalb des Berichtes eine eigene Lokalisation dar (58).

Die dominanten Lokalisationen der oralen PECA sind der Mundboden und die Zunge. Besonders vordere und seitliche Bereiche der Zunge sind häufig betroffen (59). Die weiteren Lokalisationen, wie Schleimhaut von Oberkiefer, Unterkiefer und Wange, sind deutlich seltener vom Tumor befallen. Die PECA des Mundbodens und der Zunge stellen in der westlichen Gesellschaft 50-70% der gesamten Fälle von OSCC dar (60). Jährlich werden weltweit über 300.000 Karzinome des Pharynx neu diagnostiziert. Über 43% davon machen Tumore des Nasopharynx aus, 31% des Oropharynx, 26% betreffen den Hypopharynx. Fast 160.000 Todesfälle pro Jahr werden durch diese Entitäten verursacht (1). Die Länder mit der größten Inzidenz sind Malaysia, Singapur und Indonesien. Dies wird durch die regionalen Speisegewohnheiten, wie scharfe Gewürze, nitrosaminhaltige Kost und Konservierungsmittel begründet (57). Für das OPSCC sind

die Gaumenmandeln (Tonsilla palatina) und der Zungengrund die prädominanten Läsionsorte (61). Rund 90% der Tumore des Oropharynx sind dort lokalisiert. Die weiteren anatomischen Regionen weicher Gaumen, Uvula und distaler Oropharynx sind seltener von Tumoren betroffen (62). HPV-assoziierte OPSCC entstehen bevorzugt auf lymphatischem Gewebe. Daher sind sie häufig an den Gaumenmandeln und den tiefen Krypten der Zunge lokalisiert (8, 63). Ca. 85% der Tonsillen und Zungengrund PECA sind HPV-positiv (64).

2.2.2 Risikofaktoren

Die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen und deren Vorläuferläsionen werden zu großen Teilen durch den Lebensstil der Menschen begünstigt.

Das Rauchen von Tabak und Trinken von Alkohol stellen die einflussreichsten Risikofaktoren für HNSCC dar (6, 65). Lediglich 28% der OPSCC und 36% der OSCC Fälle sind nicht mit dem Rauchen von Tabak oder Trinken von Alkohol assoziiert (66). Das Risiko für ein HNSCC ist daher bei Rauchern rund 3,5-fach erhöht gegenüber Nichtrauchern (67). Das Einstellen des Rauchens senkt bereits nach vier Jahren die Wahrscheinlichkeit für einen Kopf-Hals-Tumor um ein Drittel. Nach zwanzig Jahren Rauchfreiheit liegt das Risiko wieder auf dem Level der nichtrauchenden Bevölkerung (68). Patienten, die sowohl Rauchen als auch Alkohol konsumieren, haben ein 5,7-fach erhöhtes Risiko an einem Krebs des Rachens oder der Mundhöhle zu erkranken (66). Die steigenden Zahlen an oropharyngealen Tumorfällen, trotz der sinkenden Zahlen von Rauchern und Alkoholkonsumenten, werden den vermehrten Fällen von HPV-induzierten Tumoren zugeschrieben (8, 69). Seit den 1980er Jahren wurde in mehreren Studien die Assoziation von HPV mit PECA des Kopf-Hals-Bereichs, besonders oropharyngealer Tumoren, nachgewiesen (70). Weltweit sind jährlich rund 38.000 Fälle der Kopf-Hals-Tumore auf eine Infektion mit HPV zurückzuführen. Für 30% aller oropharyngealen Karzinome wird die virale Infektion als ursächlich angenommen (71). Es sind bisher ca. 180 Typen von Papillomaviren identifiziert worden (72). Von diesen sind die Typen 16 und 18 als Hochrisikotypen eingestuft (23, 69, 73). Eine Infektion mit HPV Typ 16 bedeutet ein 6,2-fach erhöhtes Tumorrisiko (74). Auch die Infektion mit anderen HPV-Typen steigert das Krebsrisiko im Vergleich zur Normalbevölkerung. So zeigt eine Studie von Maden et al., dass mit HPV 6 infizierte Personen ein 2,9-fach erhöhtes Risiko für orale Tumore haben (74).

Als ursächlich für die starke Verbreitung der Virusinfektion wird eine Änderung der Sexualpraktiken angesehen. Besonders oro-genitale und oro-anale Übertragungswege beschreibt die aktuelle Literatur als Risikofaktoren (71).

Generell sind diese Arten der Sexualpraktiken vermehrt in der jüngeren Bevölkerung verbreitet, sodass das HPV-assoziierte HNSCC Kollektiv im Altersschnitt 12 Jahre jünger (52 vs. 64) als das HPV-negative Kollektiv ist (75). Das Risiko einer Infektion mit einem Hochrisiko-Virustyp steigt deutlich mit der Zahl der Sexualpartner. Auf die Lebenszeit betrachtet, steigert eine Zahl von mehr als fünf verschiedenen Partnern beim Oralverkehr das Krebsrisiko um das 3,4-fache im Vergleich zur restlichen Bevölkerung (76). Die Studienergebnisse zeigen, dass hier der größere Teil der Tumorfälle männliche Patienten betrifft. Dies wird durch die höhere Zahl an Sexualpartnern sowie der häufigeren Beteiligung an oralem Geschlechtsverkehr begründet (75).

Im Vergleich zu den zwei größten Risikofaktoren, Rauchen und Alkoholkonsum, haben OSCC und OPSCC in Assoziation zu einer HPV-Infektion ein besseres Gesamtüberleben (OS) (77). Für fortgeschrittene Tumore (Stadium III/IV) liegt die 5-JÜR bei HPV-positiven Karzinomen bei rund 80%, lediglich bei 40% für HPV-negative Karzinome (24). Eine verstärkte Immunantwort des Körpers wird als ursächlich angenommen (78).

Ein weiterer bedeutender Risikofaktor für OSCC und HNSCC ist das Kauen der Betelnuss (57). Sie gilt nach Zigaretten, Alkohol und Koffein als die am vierthäufigsten konsumierte Droge weltweit (79). Es erhöht das Risiko für Mundhöhlenkrebs um das 12-fache, für Hypopharynxtumore um das 6-fache (80). Betroffen ist vor allem der asiatische Kontinent, speziell Indien und Taiwan (81). Unter der männlichen Bevölkerung Taiwans ist das OSCC die vierthäufigste Tumorentität (82). In Kombination mit Alkohol und Tabakrauchen potenziert sich das Krebsrisiko. Menschen, die Betelnüsse kauen und Rauchen, haben ein 39% höheres Risiko eine Tumorerkrankung zu erleiden (80). Als ursächlich für die Karzinogenese werden Bestandteile der Nüsse angesehen, die die Entstehung von Sauerstoffradikalen und Nitrosaminen fördern. Ein Anstieg von tumorbegünstigenden Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-6 und Cytokine wurde in Studien beschrieben (83).

2.2.3 Präkanzerosen

Die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Kopf-Hals-Bereichs entstehen größtenteils aus vorangegangenen Schädigungen des Gewebes, so genannten Vorläuferläsionen. Nur in wenigen Fällen entsteht der Tumor de novo (84). Zu den Vorläuferläsionen zählt man Leukoplakie, Erythroplakie, Lichen planus und orale submuköse Fibrose (OSF) (85).

Eine Leukoplakie definiert die WHO als weißen Plaque, der keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann (86). Rund 4% dieser Vorläuferläsionen gehen in einen Tumor über (87, 88). Sie werden in homogene und inhomogene Leukoplakien eingeteilt. Die Unterscheidung wird nach Wachstumsmuster, Form und Färbung getroffen. Unregelmäßiges Wachstum und diffuse Färbung gehen mit einem höherem Entartungsrisiko einher (85). So gehen 20% der inhomogenen Leukoplakien in einen Tumor über und nur 3% der homogenen Leukoplakien (65). Eine Leukoplakie mit gesteigerter Entartungstendenz ist die proliferative verrucöse Leukoplakie (89).

Erythroplakie ist definiert als rötlicher Fleck, der klinisch oder pathologisch keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann (90). Die Entartungstendenz ist hoch. Die Hälfte der pathologisch untersuchten Erythroplakien gehen mit einem invasiven Karzinom einher, 40% mit einem Carcinoma in situ (91).

Lichen planus oder andere lichenoiden Läsionen der Schleimhäute im Kopf-Hals-Bereich haben ein deutlich geringeres Malignitätspotential. Es gehen rund 1% der Fälle in einen Tumor über (92).

OSF betrifft größtenteils Patienten in Südostasien. Dies steht im Zusammenhang mit dem Kauen von Betel- und Arecanüssen (93). OSF verursacht beim Patienten ein schmerzhaftes Brennen und Zusammenziehen der Mundschleimhaut. Der Übergang in einen Tumor findet in rund 5% der Fälle statt (94).



Abbildung 3: Klinische Manifestation eines oralen Plattenepithelkarzinoms des linken Zungenrandes. Foto aus der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsmedizin Mainz

2.3 Diagnose und Therapie

2.3.1 Diagnostische Verfahren

Die Diagnostik von Tumoren spielt eine entscheidende Rolle für das Überleben des Patienten und die Behandlungsoptionen. Eine frühe Erkennung von pathologischen Befunden wird angestrebt. Die meisten Tumore befinden sich jedoch bei der Erstdiagnose in fortgeschrittenen Stadien. Rund zwei Drittel der Tumore sind bereits in Stadium III oder IV (95, 96). In vielen Fällen ist dies durch spät durchgeführte Diagnostik, fehlende Krankheitseinsicht oder eine lokalisationsabhängige längere Beschwerdefreiheit der Patienten zu begründen (96).

Weder für das OSCC noch OPSCC existiert zum aktuellen Zeitpunkt ein standardisiertes Screening. Ko et al. zeigten, dass in Hochrisikogruppen eine visuelle Inspektion des Mund-Rachen-Raums eine relevante Zahl an Fällen aufdecken kann und dadurch tumorassoziierte Todesfälle vermeidbar sind (97). Die Studie weist für die visuelle Kontrolle eine Sensitivität von ca. 60% und eine Spezifität von ca. 98% auf (98). Bei auffälligen Befunden wird eine erweiterte Untersuchung der Mundhöhle, des Pharynx und Larynx empfohlen, um multilokuläres Tumorwachstum oder synchrone Zweittumore zu entdecken. Durch dieses Verfahren lassen sich besonders Patienten erkennen, bei denen der Tumor noch keine Symptome verursacht hat (97).

Für die definitive Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich erfolgt obligat eine Probenentnahme zur pathologischen Sicherung (99).

Typische Folge der pathologischen Veränderungen in Mund- und Rachenraum sind Schmerzen, Foetor, offene, ulzerierte Schleimhäute mit Blutungen, Heiserkeit, Husten sowie Schluck- und Sprachprobleme. Darüber hinaus sind beim OSCC Lockerungen der Zähne und veränderte Okklusion als Symptome möglich (100).

Die frühzeitige Erkennung eines Tumors hat bedeutenden Einfluss auf das Outcome der Patienten (101). Neben der bereits erwähnten visuellen Inspektion kommen auch bildgebende Verfahren in der Diagnostik zum Einsatz, vorrangig Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT). Beide Untersuchungsverfahren zeigen Vor- und Nachteile, sodass in vielen Fällen der Einsatz mehrerer bildgebender Verfahren angewandt wird (102). Die MRT bietet eine bessere Weichteilauflösung, ist weniger anfällig für Artefakte und hat keine Strahlenbelastung. Die CT ist schneller durchführbar, ist weniger anfällig für Störungen durch Kehlkopfbewegungen und bietet eine genauere Auflösung bei knöcherner Beteiligung des Tumors (103, 104)

Die Positronenemissionstomographie-Computertomographie (PET-CT) kommt ebenfalls zum Einsatz und wird besonders für die Suche von Lymphknoten- und Fernmetastasen genutzt (105).

Für die Prognose und Therapieplanung bei einem OSCC oder OPSCC ist der HPV-Status von großer Bedeutung, da HPV-positive Tumore mit einer deutlich besseren Prognose einhergehen und anders klassifiziert werden als HPV-negative PECA (106) (s.2.2.2; s. 5.7). Es gibt unterschiedliche Wege eine HPV-Infektion nachzuweisen. Mittels in situ Hybridisierung (ISH) von Gewebeproben ist ein direkter, verlässlicher Nachweis von HPV möglich (107). Durch den hohen technischen und finanziellen Aufwand ist dieses Verfahren nicht standardisiert im Einsatz. Eine valide, kostengünstigere Alternative stellt der indirekte Nachweis durch die immunohistochemische Färbung (IHC) des Tumorsuppressorproteins cyclin dependent kinase inhibitor 2A/Protein 16 (p16) dar (108). Der Nachweis des Biomarkers p16 ist ein Anzeichen für HPV-vermittelte Tumorentstehung (109). Neuartige Schnelltests zur p16-Detektion werden aktuell in Studien getestet (110). Zur Entdeckung von Lymphknotenmetastasen und auch zur Beurteilung der Tumore steht mit dem Ultraschall ebenfalls eine weitere Untersuchungsart zur Verfügung, die sowohl kostengünstig als auch strahlungsfrei anwendbar ist (111)

2.3.2 TNM-Klassifikation

Seit vielen Jahren werden solide Tumore im klinischen Alltag mit Hilfe der TNM-Klassifikation bewertet (112). Das TNM-System ist eine in den 1940er/50er Jahren von Pierre Denoix entwickelte Einteilung für solide Tumorerkrankungen (113). Die Klassifikation hilft in mehreren Aspekten. Sie soll die Behandelnden bei der Planung unterstützen, eine Prognose ermöglichen, die Erfolge einer Behandlung evaluieren, den Informationsaustausch zwischen Behandelnden vereinfachen und Tumorerforschung sowie Tumorkontrolle weiter voranbringen (113). Die Klassifikation wird durch die „International Union for Cancer Control“(UICC) und das „American Joint Committee on Cancer“ (AJCC) regelmäßig an den neuesten wissenschaftlichen Stand angepasst (114). Die Entwicklung geht zu immer detaillierteren, auf konkrete Krankheitsfälle zugeschnittenen Klassifikationen. Diese ermöglichen eine präzisere Aussage zum OS und DFS (115). Jede TNM-Klassifikation beinhaltet eine Aussage zur Tumorausbreitung „T“, ob Lymphknotenmetastasen vorliegen „N“ und ob der Tumor bereits Fernmetastasen „M“ gebildet hat (116). Diese drei Faktoren werden durch klinische Untersuchung, Bildgebung oder pathologische Analyse abgeklärt.

Der T-Status (T0-4) beinhaltet in erster Linie die Größe des Tumorgewebes. Des Weiteren fließt eine mögliche Infiltration von umliegendem Gewebe mit in die Klassifikation ein. Der Lymphknotenstatus (N0-3) gibt die Größe und Lokalisation

möglicher Metastasen an. Der M-Status ist bei vorliegender Fernmetastase positiv (M1). Je höher der einzelne Status, desto negativer ist der Einfluss des einzelnen Faktors auf das Gesamtüberleben des betroffenen Patienten. Die Faktoren T, N, M werden in einer Stadieneinteilung (0-IV) des Tumors zusammengefasst und nach Malignität gewichtet. Dennoch stellt die TNM-Klassifikation eine beobachtende Einteilung dar, die keine Aussage bezüglich der Beschaffenheit und zum Wachstumsverhalten eines Tumors beinhaltet (112).

Im Jahr 2017 ist zuletzt eine aktualisierte 8. Ausgabe der TNM Klassifikation für Kopf-Hals-Tumore veröffentlicht worden (106). Diese aktuell gültige Ausgabe beachtet erstmalig die HPV-assoziierten Tumore, für die bisher die Aussagekraft bezüglich der Prognose in der vorherigen Klassifikation zu gering ausfiel (116). Die Überlebenschance für HPV-assoziierte Tumore wurde mit der alten Klassifikation häufig zu negativ bewertet (117). Auf Basis der ICON-S Studie von O’Sullivan et al. wurde die modifizierte, neue TNM-Klassifikation an die Unterschiede zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs angepasst (118). Da die in dieser Studie ermittelten Daten nach der alten Klassifikation erhoben worden sind, ist diese hier aufgeführt. Darüber hinaus wird in der aktualisierten TNM-Klassifikation ein verstärktes Augenmerk auf extranodales Wachstum (ENE) der Lymphknotenmetastasen gelegt (119).

TNM Klassifikation für OSCC

Primärtumor		
	7. Auflage TNM-Klassifikation	8. Auflage TNM-Klassifikation
Tx	nicht beurteilbar	<i>nicht beurteilbar</i>
T0	kein Tumornachweis	<i>kein Tumornachweis</i>
Tis	Carcinoma in situ	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumor ≤2 cm Ø	<i>Tumor ≤2 cm Ø, Invasionstiefe ≤5 mm</i>
T2	Tumor 2 – 4 cm Ø	<i>Tumor ≤2 cm Ø bei Invasionstiefe 5 - 10 mm oder Tumor 2 – 4 cm Ø bei Invasionstiefe ≤10 mm</i>
T3	Tumor >4 cm	<i>Tumor >4 cm Ø oder >10 mm Invasionstiefe</i>

Literaturdiskussion

T4a	Tumor infiltriert Zungenmuskulatur, Kieferknochen, Kieferhöhle oder Gesichtshaut	<i>Tumor infiltriert Nachbarstrukturen</i>
T4b	Tumor infiltriert Schädelbasis, Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder umfasst die Arteria carotis interna	
Lymphknoten (regional)		
	7. Auflage TNM-Klassifikation	8. Auflage TNM-Klassifikation
N1	solitäre Lymphknotenmetastase ipsilateral, ≤3 cm Ø	<i>solitäre Lymphknotenmetastase ipsilateral, ≤3 cm Ø, ENE-</i>
N2a	solitäre Lymphknotenmetastase ipsilateral, 3 – 6 cm Ø	<i>solitäre Lymphknotenmetastase ipsilateral, 3 – 6 cm Ø ENE- oder solitäre Lymphknotenmetastase ipsilateral <3 cm ENE+</i>
N2b	multiple Lymphknotenmetastasen ipsilateral, <6 cm Ø	<i>multiple Lymphknotenmetastasen ipsilateral, <6 cm Ø ENE-</i>
N2c	bilaterale oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen, <6 cm Ø	<i>bilaterale oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen, <6 cm Ø ENE-</i>
N3 (a,b)	Lymphknotenmetastase(n) >6 cm Ø	<i>Lymphknotenmetastase(n) >6 cm Ø ENE-</i>
		<i>solitäre Lymphknotenmetastase ipsilateral, >3 cm Ø ENE+ oder multiple</i>

		<i>Lymphknotenmetastasen mind. 1x ENE+ oder solitäre kontralaterale Lymphknotenmetastase ≤3 cm ENE+</i>
Fernmetastasen		
	7. Auflage TNM-Klassifikation	8. Auflage TNM-Klassifikation
Mx	nicht beurteilbar	<i>nicht beurteilbar</i>
M0	keine Fernmetastase	<i>keine Fernmetastase</i>
M1	jede Fernmetastase	<i>jede Fernmetastase</i>

Tabelle 1: Vereinfachte Darstellung der TNM Klassifikation (7. Auflage) für OSCC modifiziert nach Bradish et al. 2020 (120) und der TNM Klassifikation (8. Auflage) für OSCC modifiziert nach der aktualisierten S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom 2021 (13).

Tumorstadien nach UICC für OSCC

Stadium	7. Auflage TNM-Klassifikation	8. Auflage TNM-Klassifikation
Stadium I	T1	<i>T1</i>
Stadium II	T2	<i>T2</i>
Stadium III	T1, T2 + N1 / T3 + N0, N1	<i>T1, T2 + N1 / T3 + N0, N1</i>
Stadium IVa	T1, T2, T3 + N2 / T4a + N0, N1, N2	<i>T1, T2, T3 + N2 / T4a + N0, N1, N2</i>
Stadium IVb	T4b + jedes N / jedes T + N3	<i>T4b + jedes N / jedes T + N3</i>
Stadium IVc	jeder M1	<i>jeder M1</i>

Tabelle 2: Tumorstadien nach UICC beim OSCC modifiziert nach der S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom Version 2.0, 2012 (121) und der aktualisierten S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom Version 3.0, 2021 (13).

TNM Klassifikation für OPSCC

Primärtumor		
	7. Auflage TNM-Klassifikation	8. Auflage TNM-Klassifikation (HPV-positive OPSCC)

Literaturdiskussion

Tx	nicht beurteilbar	<i>nicht beurteilbar</i>
T0	kein Tumornachweis	<i>kein Tumornachweis</i>
Tis	Carcinoma in situ	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumor ≤ 2 cm \emptyset	<i>Tumor ≤ 2 cm \emptyset</i>
T2	Tumor 2 – 4 cm \emptyset	<i>Tumor 2 – 4 cm \emptyset</i>
T3	Tumor >4 cm \emptyset	<i>Tumor >4 cm \emptyset</i>
T4a	Tumor infiltriert Zungenmuskulatur, Larynx, Lamina medialis des Processus pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer	<i>Tumor infiltriert Zungenmuskulatur, Larynx, Lamina medialis des Processus pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer</i>
T4b	Tumor infiltriert Schädelbasis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus oder umfasst die Arteria carotis interna	<i>Tumor infiltriert Schädelbasis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus oder umfasst die Arteria carotis interna</i>
Lymphknoten (regional)		
	7. Auflage TNM-Klassifikation	8. Auflage TNM-Klassifikation (HPV-positive OPSCC)
N1	solitäre Lymphknotenmetastase ipsilateral, ≤ 3 cm \emptyset	<i>Lymphknotenmetastase(n) ipsilateral, ≤ 6 cm \emptyset</i>
N2a	solitäre Lymphknotenmetastase ipsilateral, 3 – 6 cm \emptyset	<i>Lymphknotenmetastase(n) kontra- oder bilateral, <6 cm \emptyset</i>
N2b	multiple Lymphknotenmetastasen ipsilateral, <6 cm \emptyset	
N2c	bilaterale oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen, <6 cm \emptyset	
N3	Lymphknotenmetastase(n) >6 cm \emptyset	<i>Lymphknotenmetastase(n) >6 cm \emptyset</i>
Fernmetastasen		
	7. Auflage TNM-Klassifikation	8. Auflage TNM-Klassifikation (HPV-positive OPSCC)

Mx	nicht beurteilbar	<i>nicht beurteilbar</i>
M0	keine Fernmetastase	<i>keine Fernmetastase</i>
M1	jede Fernmetastase	<i>jede Fernmetastase</i>

Tabelle 3: Vereinfachte Darstellung der TNM-Klassifikation für HPV-negative und HPV-positive OPSCC. Modifiziert nach Lydiatt et al. 2017 (109)

Tumorstadien nach UICC für OPSCC

Stadium	7. Auflage TNM-Klassifikation	8. Auflage TNM-Klassifikation (HPV-positive OPSCC)
Stadium I	T1, N0	<i>T1, T2 + N0, N1</i>
Stadium II	T2, N0 / T1, N1	<i>T1, T2 + N2 / T3, T4, + N0, N1</i>
Stadium III	T3, N0-2 / T1-2, N2	<i>T3, T4 + N2</i>
Stadium IVa	T4, N2	<i>jedes M1</i>
Stadium IVb	jedes T, N3	
Stadium IVc	jeder M1	

Tabelle 4: Auflistung der Tumorstadien für OPSCC nach TNM (7. Aufl.) modifiziert nach Pan et al. 2016 (122) und für p16 positive OPSCC nach TNM (8. Aufl.) modifiziert nach Lydiatt et al. 2017 (109).

2.3.3 Therapie des Plattenepithelkarzinoms

Für die Therapie des OSCC und HNSCC kommen diverse Optionen in Frage. Es wird chirurgisch entfernt, bestrahlt, chemotherapeutisch oder antikörperbasiert behandelt. In fortgeschrittenen Stadien findet eine kombinierte Therapie Anwendung (96).

2.3.3.1 Chirurgie

Die chirurgische Tumorentfernung stellt die häufigste Therapie dar (11). Die vollständige Exzision des entarteten Gewebes ist besonders in frühen Stadien (Stadium I/II) des Karzinoms der Goldstandard. Dadurch kann der Krebs bei 80% (Stadium I) bzw. 65% (Stadium II) der Betroffenen geheilt werden (123). Diese frühen Tumorstadien können auch durch alleinige oder ergänzende Radiotherapie mit vergleichbar erfolgreichen Ergebnissen behandelt werden (124). In den Tumorstadien III und IV greifen kombinierte Therapiekonzepte. Die aktuelle S3-Leitlinie zum Mundhöhlenkarzinom sieht beim OSCC keine kurative Therapieoption als eindeutig überlegen an (13). Als negativer prognostischer Faktor gilt für beide Entitäten das Vorhandensein von Fernmetastasen (11).

2.3.3.2 Radiatio

Die Bestrahlung des Tumors ist eine häufig angewandte Therapieoption. Sowohl alleinige Bestrahlung als auch Radiochemotherapie kommen zum Einsatz (125). Dennoch erzielt die Bestrahlung nur bei rund der Hälfte der Behandelten ein dauerhaftes Ansprechen der Therapie (126). Als Nebenwirkung führt die Bestrahlung zu einer vermehrten Fibrosierung des Gewebes (127). Durch die Strahlentherapie können funktionelle Probleme wie Sprach- und Schluckstörungen oder ästhetische Veränderungen auftreten (128). Die intensitätsangepasste Bestrahlung hat durch Schonung von umliegendem Gewebe die Lebensqualität der Betroffenen deutlich verbessert und Nebenwirkungen reduziert (129). Dennoch bestehen langfristige, bei Anwendung nicht voraussehbare, Risiken durch Strahlenfolgen, die bei chirurgischer Exzision der Tumore nicht gegeben sind.

2.3.3.3 Chemotherapie

Eine alleinige Chemotherapie wird für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom in palliativer Situation angeboten. Der Einsatz von Chemotherapeutika findet in einer kombinierten Radiochemotherapie neoadjuvant und adjuvant statt. Durch eine kombinierte Radiochemotherapie kann sowohl eine Sensibilisierung für die Bestrahlung als auch eine Verminderung der Strahlendosis erreicht werden (125). Als Chemotherapeutika werden beim oralen Plattenepithelkarzinomen Cisplatin und Kombinationen eines Antimetaboliten oder Taxans (z.B. 5-Fluoruracil oder Docetaxel) mit Cisplatin eingesetzt. Bei oropharyngealen Karzinomen kommt ebenfalls Cisplatin oder auch Carboplatin zum Einsatz. Kombinationen mit 5-Fluoruracil und/oder Mitomycin C sind möglich (130).

2.3.3.4 Targeted therapy

Innerhalb der letzten Jahre lässt sich eine wachsende Bedeutung der gezielten Tumorthherapie beobachten. Im Vergleich zur herkömmlichen Chemotherapie nutzt die targeted therapy spezifische Eigenschaften der jeweiligen Tumorentität. Die jeweiligen Agenzien greifen beispielsweise an Stoffwechselprozessen, Membranproteinen oder der Angiogenese gezielt an (131).

Im Rahmen einer Radiochemotherapie kommt beim OSCC und OPSCC seit mehreren Jahren der EGFR (epidermal growth factor receptor) -Antikörper Cetuximab zum Einsatz. Anwendung findet Cetuximab bei fortgeschrittenen und metastasierten Karzinomen. Der Antikörper ist aktuell Bestandteil der third line Therapie. Er wird mit

einer platinhaltigen Chemotherapie kombiniert und zeigt bei ausgeprägter EGF-Expression des Tumors positive Ergebnisse (132). Das EXTREME-Schema beinhaltet eine Kombination von Cis- oder Carboplatin, 5-Fluoruracil und Cetuximab. Dieses Therapieschema zeigte ein deutlich verbessertes OS der Patienten gegenüber einer Therapie ohne Cetuximab (133).

2.3.3.5 Immuntherapie

Der zweite therapeutische Arm, der sich neben der targeted therapy entwickelt hat, ist die Immuntherapie. Diese zielt im Speziellen auf die Immunreaktion des Körpers im Zusammenhang mit einer Krebserkrankung ab (131). Es werden beispielsweise die T-Zellen in ihrer Funktion gebremst, Signaltransduktion wird geblockt oder die Freisetzung von Zytokinen wird unterdrückt (134). In die Gruppe der Immuntherapeutika fallen auch die PD-1- Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab, sowie die PD-L1-Antikörper Atezolizumab, Avelumab und Durvalumab. Diese monoklonalen Antikörper gegen den PD-1/PD-L1-Checkpoint wirken ebenfalls modulatorisch auf das Immunsystem (s. 2.3.2). Durch diese Agenzien, wie beispielsweise Nivolumab kann die T-Zell-Reaktion und körpereigene Tumorabwehr gesteigert werden (135). Nach positivem Ausfall der CheckMate 141 Studie von Ferris et al. wurde Nivolumab 2017 zur Therapie bei fortgeschrittenen HNSCC und erfolgloser Platintherapie zugelassen (136). Ebenfalls wurde Pembrolizumab 2019 für den Einsatz von fortgeschrittenen HNSCC zugelassen. Grundlegend hierfür war die Keynote 048 Studie von Burtness et al (137).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gewebeentwässerungsautomat	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
CoverStainer	Dako/Agilent, Santa Clara, USA
TMArrayer	Pathology Devices, San Diego, USA
Rotationsmikrotom	Zeiss Hyrax M55, Jena, Deutschland

3.1.2 Reagenzien, Chemikalien

Histo-Clear II REF:HS-202	National diagnostics, Atlanta, USA
Ethanol 96%	SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
Ethanol 70%	SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
Ethanol 99%	SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
Dako Hämatoxylin REF:CS700	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Dako Bluinpuffer REF:CS702	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Dako Eosin REF:CS701	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Real Dako Hämatoxylin REF: 2020	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Envision Flex+Rabbit (Linker)	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Dako EnVision Flex Target Retrieval Solution low pH	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Dako EnVision Flex Peroxidase-Blocking Reagent	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Dako EnVision Flex HRP	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Dako EnVision Flex Substrate Buffer	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Dako EnVision Flex DAB+ Chromogen	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Dako EnVision Flex Wash uffer	Agilent Dako, Santa Clara, USA
Dako EnVision Flex+Mouse	Agilent Dako, Santa Clara, USA

3.1.3 Antikörper

CINtech ® Histology Kit	Anti-PD-L1 antibody [EPR19759]
Mouse monoclonal	Rabbit monoclonal [EPR19759] to PD-L1
Ventana, Oro Valley, USA	Abcam, Berlin, Deutschland

3.1.4 Software

EndNote X8	Alfasoft GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Microsoft Office Word 2016	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft, Redmond, USA
NDP.view 2	Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan
SPSS 23	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
HALO™ Image Analysis Software	Indica Lab, Albuquerque, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenkollektiv

In die Studie eingeschlossen wurden ausschließlich Patienten mit einem histologisch bestätigten oralen oder oropharyngealen Plattenepithelkarzinom.

Das Kollektiv wurde aus den Abteilungen der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Plastische Operationen der Universitätsmedizin Mainz und Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und Kopf-Hals-Chirurgie der Universitätsmedizin Mainz generiert.

Insgesamt wurden im Rahmen der Studie 441 Schnitte der Pathologie gesichtet. 67 Gewebeproben konnten auf Grund von mangelhaftem Material, Artefakten bei Erstellung des tissue microarray (TMA) oder der Färbung nicht in die Auswertung einbezogen werden. Für viele Patienten lagen mehrere pathologische Schnitte vor. Von diesen erfassten einige nicht den Tumor, beinhalteten zu wenig Tumorgewebe oder stellten nicht den Primarius dar. Abschließend konnten 161 Fälle eingeschlossen werden.

3.2.2 Gewinnung von Patientenmaterial

Die Gewebeproben wurden den Patienten im Rahmen einer chirurgischen Tumorentfernung entnommen. Bereits im Operationssaal wurden die Tumorproben in Formalin gebettet, um den Gewebeerfall aufzuhalten. Das verwendete Gewebe wurde von der Gewebe-Biobank der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt und in Übereinstimmung mit den Regularien der Gewebe-Biobank (#GB000218) und dem Votum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Mainz (Ärztekammer Rheinland-Pfalz, Nr.: 2018-13844) verwendet.

3.2.3 Konservierung von Patientenmaterial

Das Patientenmaterial wurde in dem Institut der Pathologie nach den etablierten Standardverfahren aufgearbeitet. Mittels Formalinfixierung wurden die Proteine vernetzt. Dadurch standen sie zur späteren Darstellung zur Verfügung.

3.2.4 Erstellung von Paraffinschnitten

In einer makroskopischen Analyse des Patientengewebes wurde das eingegangene Material präpariert und markiert. Das verbliebene Resektat wurde anschließend in einem Gewebeentwässerungsautomat (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) konserviert.

Um die Zersetzung des Gewebes aufzuhalten, wurde das Präparat in 4%igen gepuffertem Formalin eingelegt. Danach durchlief es eine aufsteigende Alkoholreihe. Diese entzog dem Resektat das verbliebene Wasser. Durch den Einsatz von Xylol ließ sich das Gewebe in einen Paraffinblock einbinden.

Der entstandene Block wurde durch ein Rotationsmikrotom (Zeiss Hyrax M55, Jena, Deutschland) in 2µm dicke Schnitte geschnitten. Dieser Paraffinschnitt wurde daraufhin auf einen Objektträger aufgezogen, getrocknet und schließlich gefärbt.

3.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die routinemäßige Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde im CoverStainer (Dako/Agilent, Santa Clara, USA) durchgeführt. Zu Beginn wurden die zu färbenden Objektträger 360 Sekunden (s) in Xylol zum Entparaffinieren inkubiert. Um das Xylol aus dem Schnitt zu lösen, wurde eine absteigende (von 100% zu 70%) Ethanolreihe (Rehydrierung) mit jeweils 120 s Inkubationszeit bis zum Abschluss mittels Aqua dest durchgeführt. Als ersten Schritt der Färbung wurde für 90 s Hämatoxylin zugegeben. Anschließend folgte

wieder eine Bläuung mit Leitungswasser für 60 s. Es folgte für 90 s ein Puffer, der für die benötigte Alkalität bei der primären Färbung sorgte.

Nach 60 s Alkoholbad in 70% Ethanol, wurde für weitere 60 s die Eosin Färbung vollzogen. Dieser folgte eine Alkoholreihe für 60 s bei 96% Ethanol und 180 s bei 99% Ethanol. Abgeschlossen wurde der HE-Färbeprozess durch das Xylol als Intermedium zum Entellan, für das Eindecken des gefärbten Schnitts mit einem Deckglas.

3.2.6 Erstellung des TMA

Unter Kontrolle im Mikroskop wurden auf dem Objektträger die Tumorareale eingezeichnet. Dieser eingezeichnete Bereich wurde anschließend mit dem kongruenten Paraffinblock (Spenderblock) für das TMA genutzt. Unter Zuhilfenahme des TMArrayer (Pathology Devices, San Diego, USA) wurde aus dem Patientenmaterial im Paraffinblock ein 1mm großes Gewebestück innerhalb des eingezeichneten Bereichs ausgestanzt. Dieses entnommene Material wurde anschließend in einen neuen, unbestückten Paraffinblock (Empfängerblock) eingebracht.

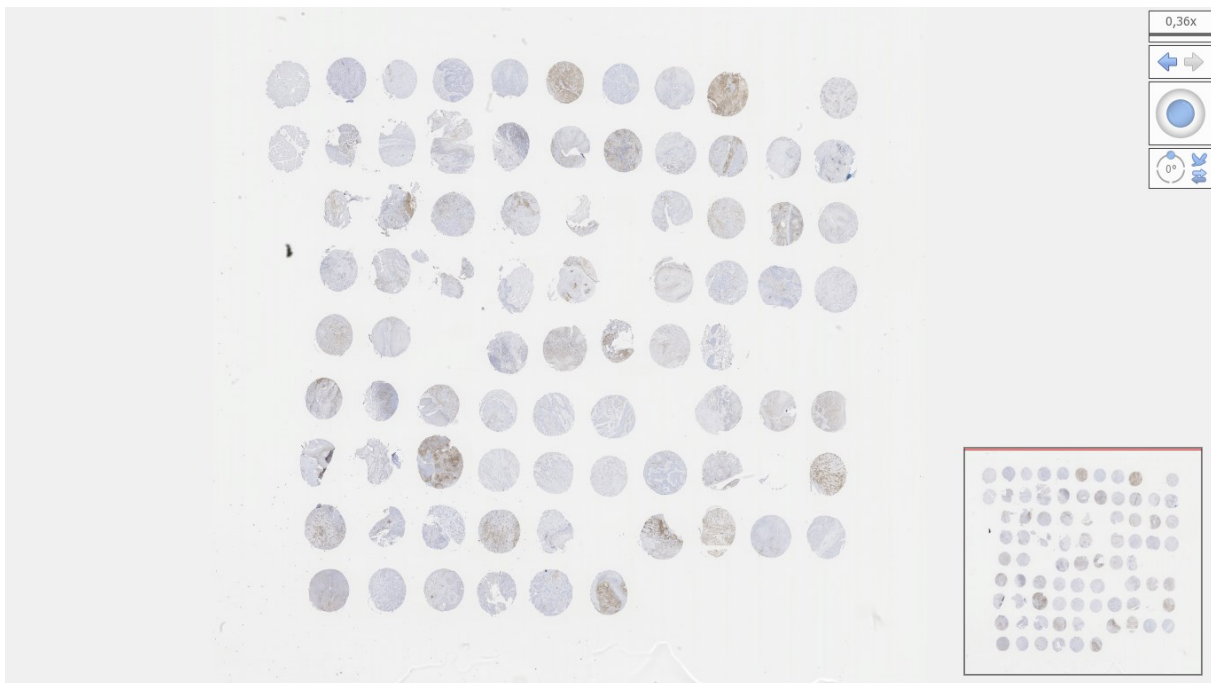


Abbildung 4: Darstellung eines gesamten TMA mittels NDP.view2 (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan)

So wurde mit den weiteren Paraffinblöcken ebenfalls verfahren. Sie wurden strukturiert nebeneinander eingefügt. Anschließend wurde von dem Empfängerblock mit dem Rotationsmikrotom (Zeiss Hyrax M55, Jena, Deutschland) ein Paraffinschnitt angefertigt und auf einem Objektträger fixiert (s. 3.2.4) (138).

3.2.7 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Färbung von PD-L1 mussten die angefertigten TMAs 30 Minuten lang bei 60 Grad Celsius entparaffiniert werden. Daraufhin erfolgte eine Rehydrierung mit absteigender Alkoholreihe und ein Bad in destilliertem Wasser. Im Dampfgerar wurden bei einem sauren pH-Wert 6 der Objektträger mit dem Antigen-Retrieval Citrat Puffer für die immunhistochemische Färbung vorbereitet. Dieser brach die in der Formalinfixierung hergestellten Proteinvernetzungen wieder auf. Nach einer fünfminütigen Waschung in Pufferlösung wurden die TMAs in den Autostainer eingesetzt. Dort fand nach Vorgaben des Herstellers die Färbung mit den 1:250 verdünnten PD-L1-Antikörper statt. Anschließend wurde eine Waschung in destilliertem Wasser und eine Dehydrierung mit aufsteigender Alkoholreihe und Xylol durchgeführt. Durch Eindeckeln mittels Entellan wurde die antikörperspezifische Färbung abgeschlossen.

Die IHC zum Nachweis von p16 erfolgte größtenteils analog zur der IHC von PD-L1. Erst wurden die Objektträger entparaffiniert, anschließend folgte eine absteigende Alkoholreihe. Ebenfalls wurde für die p16-Färbung der vorbereitende Schritt im Dampfgerar, sowie das Bad in der Pufferlösung durchgeführt. Der unterscheidende Schritt erfolgte mit Anwendung des CINtech ® Histology Kit. Dieser p16 spezifische Antikörper wurde gemäß der Herstellerangaben im Autostainer angewandt. Die IHC von p16 endet wie die Färbung von PD-L1 mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und einer Eindeckelung durch Entellan. Die Methodik orientierte sich an Standards, wie sie in vielen aktuellen Studien verwendet werden (139).

3.2.8 Auswertung mit der Halo Software

3.2.8.1 Differenzierung des Gewebes

Mit Hilfe der Halo Software (Indica Lab, Albuquerque, USA) wurde das Gewebe, wie bereits in der Literatur beschrieben, computergesteuert ausgewertet (140). Dazu wurden drei Gruppen, sogenannte Classifier, (Tumorgewebe, Stroma, Deckglas) erstellt. Für die Classifier wurden manuell mehrere Referenzbereiche auf unterschiedlichen TMAs markiert. Anhand der definierten Areale hat das Programm alle TMAs ausgewertet. Unscharfe oder überlagerte Bereiche wurden manuell markiert und aus der Analyse ausgeschlossen. Die Auswertung des Halo Programms beinhaltet die absolute Fläche, Fläche aufgeteilt in die drei Classifier, gesamte Zellzahl, Anzahl an Tumorzellen, Anzahl an Stromazellen.

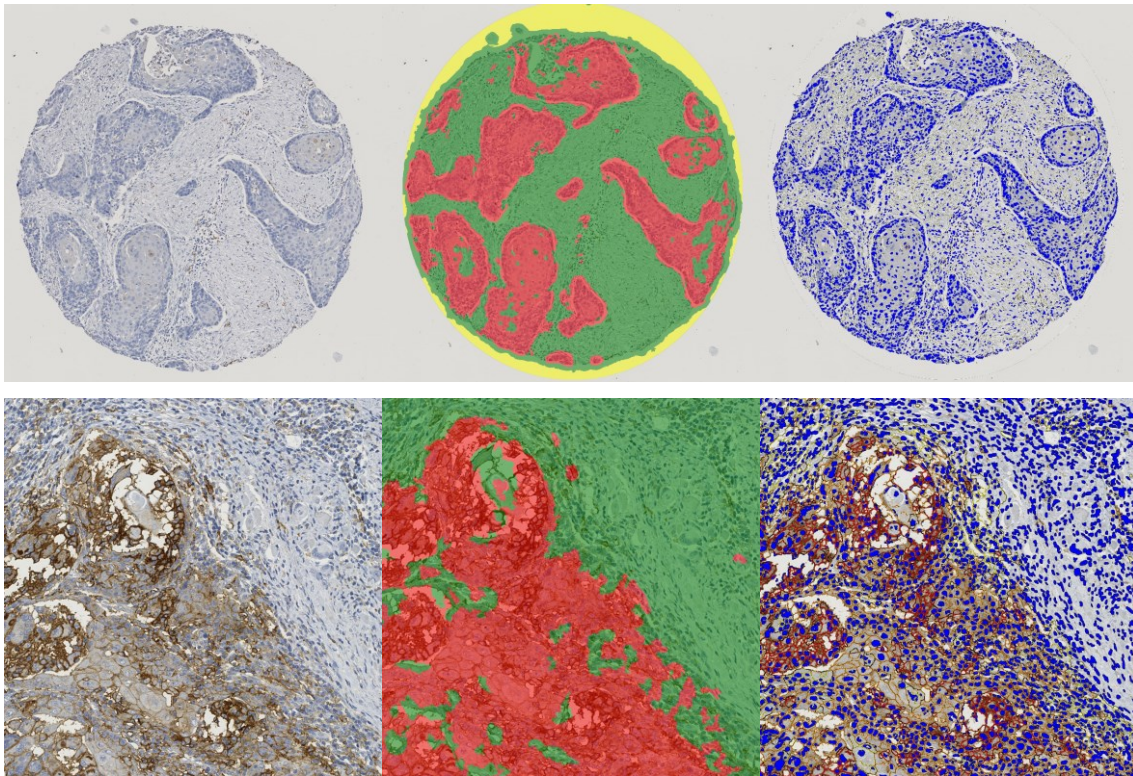


Abbildung 5: Die Abbildung zeigt die Arbeitsschritte des Halo Programms (Indica Lab, Albuquerque, USA). Obere Reihe: Darstellung des kompletten Cores. Untere Reihe: Ausschnitt aus dem Core. Links: PD-L1-Färbung. Mitte: mittels Classifier werden Stromazellen (grün) und Tumorzellen (rot), sowie der Objektträger (gelb) angefärbt. Rechts: Die computergestützte Analyse zählt die beteiligten Zellen anhand der Zellkerne (dunkelblau) und unterscheidet die gefärbten Zellen anhand der Färbeintensität (gelb, orange, rot).

3.2.8.2 Auswertung der IHC

Das Halo Programm bestimmte von jeder Zellmembran auf dem zu untersuchenden Core, ob sie Farbe der Immunhistochemie angenommen hat oder nicht. Daraus erfolgte eine Einteilung in positive und negative Zellen. Sowohl absolute Zahlen als auch der prozentuale Anteil wurden errechnet. Daraus ergab sich der TPS (Tumor Proportion Score). Dieser wird in Prozent angegeben. Er bezieht sich auf den Anteil aller Tumorzellen, die in ihrer Zellmembran Farbstoff des Antikörpers angereichert haben. Für die weitere Auswertung der PD-L1-Expression wurde der TPS in den Cologne Score umgerechnet. Dieser wurde von Scheel et al. zur Kategorisierung von PD-L1 beim NSCLC entwickelt (141). Er ergibt eine semiquantitative Darstellung der prozentualen Expression. Der Cologne Score unterteilt den TPS in 6 Stufen (0-5). TPS unter 1% gelten als negativ.

	Negativ	positiv				
	0	1	2	3	4	5
Bereich in %	0-1	1-5	5-10	10-25	25-50	50-75

Tabelle 6: Cologne Score. Modifiziert nach: Scheel et al. (2016)

Die Software ermöglichte eine semiquantitative Einschätzung der Färbeintensität. Es gab drei Stufen der Positivität: weak (schwach, 1), medium (mittel, 2) und strong (stark, 3). Die Gruppierung wurde anhand der Voreinstellungen des Halo-Programms getroffen. Diese Einstellung wurde auf alle vorhandenen Cores angewendet. Die Auswertung beinhaltete die prozentuale Verteilung der gefärbten Zellen von Stroma und Tumorgewebe. Aus dieser semiquantitativen Färbung errechnete der Computer den Histoscore (H-score). Dieser diente als Bewertungsalgorithmus für IHC-Färbungen. Der Histoscore berechnet sich anhand der drei ausgegebenen Färbeintensitäten. $\text{Histoscore} = 1 \times \% \text{ schwach gefärbter Zellen} + 2 \times \% \text{ mittel gefärbte Zellen} + 3 \times \% \text{ stark gefärbter Zellen}$. Daraus ergeben sich Werte von 0 bis maximal 300 (142). Dieser Histoscore kann in vier Gruppen unterteilt werden. Bei erreichten Punkten von 0 wird er als negativ gewertet. 1-100 Punkte stellen einen schwachen, 101-200 eine mittleren und 201-300 einen hohen Histoscore dar (143).

3.2.9 Auswertung der HPV-Expression

Die Auswertung der HPV-Expression (p16) erfolgte nach der S1-Leitlinie zur pathologisch-anatomischen Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (Stand 2017). Nach dieser wurden nur Tumore mit einer Anfärbung von >70% der Tumorzellen als HPV-positiv gewertet (108). Tumore mit einer ausschließlich schwachen Färbung wurden ebenfalls ausgeschlossen. Dieser Auswertung erfolgte analog zur der IHC für PD-L1 mit der Halo Software (s. 3.2.8).

3.2.10 Statistische Methodik

Für die Verwaltung der Patientendaten wurde die Microsoft Office Word 2016 (Microsoft, Redmond, USA), Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, Redmond, USA) und Software IBM SPSS Statistics 23 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) verwendet. Die Erstellung der Grafiken erfolgte mit Microsoft Office Word 2016, Microsoft Office PowerPoint 2016 und Software IBM SPSS Statistics 23.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics 23. Die Interpretation und Einordnung der Daten wurde unterstützt durch Herrn MSc Gerrit Toenges, Mitarbeiter am Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI), Universitätsmedizin Mainz.

Die Altersstruktur und die PD-L1-Expression wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Die PD-L1-Expression wurde bei Bedarf für eine bessere Vergleichbarkeit anhand von cut-offs und des Medians geteilt. Somit konnte die PD-L1-Expression als binäres Merkmal in die Auswertung eingebracht werden. Für die Auswertung des OS und des rezidivfreien Überlebens wurden Kaplan-Meier-Analysen und Cox-Regressionen durchgeführt. Für die Erfassung der Daten der Überlebenszeit wurde der Todesfall als Endpunkt definiert. Für das DFS wurde das Datum der Diagnose eines Rezidivs als Ereignis festgelegt. Die gesamte Datenanalyse war rein explorativ und erfolgte somit ohne Kontrolle des globalen Fehlers erster Art. Dies ist bei der Interpretation von p-Werten zu beachten. Ein p-Wert von < 0.05 wurde daher nur als statistisch auffällig/relevant, jedoch nicht als statistisch signifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Studienpopulation

In dieser Studie wurden repräsentative TMAs von 161 Patienten ausgewertet. Das Geschlechterverhältnis zeigte mit 99 männlichen Patienten und 62 weiblichen Patientinnen ein deutliches Übergewicht auf Seiten der Männer. Bei der Diagnose war das Gesamtkollektiv im Mittelwert 64,4 Jahre (Standardabweichung (SD): $\pm 10,6$) alt. Das jüngste Diagnosealter lag bei 38 Jahren, das höchste war 91. Der Altersschnitt zwischen Frauen und Männern unterschied sich nur geringfügig. Die Frauen waren im Mittel 1,4 Jahre älter (65,3 zu 63,9).

In den Tests nach Kolmogorov-Smirnov ($p=0,2$) und Shapiro-Wilk ($p=0,574$) zeigte sich eine Normalverteilung.

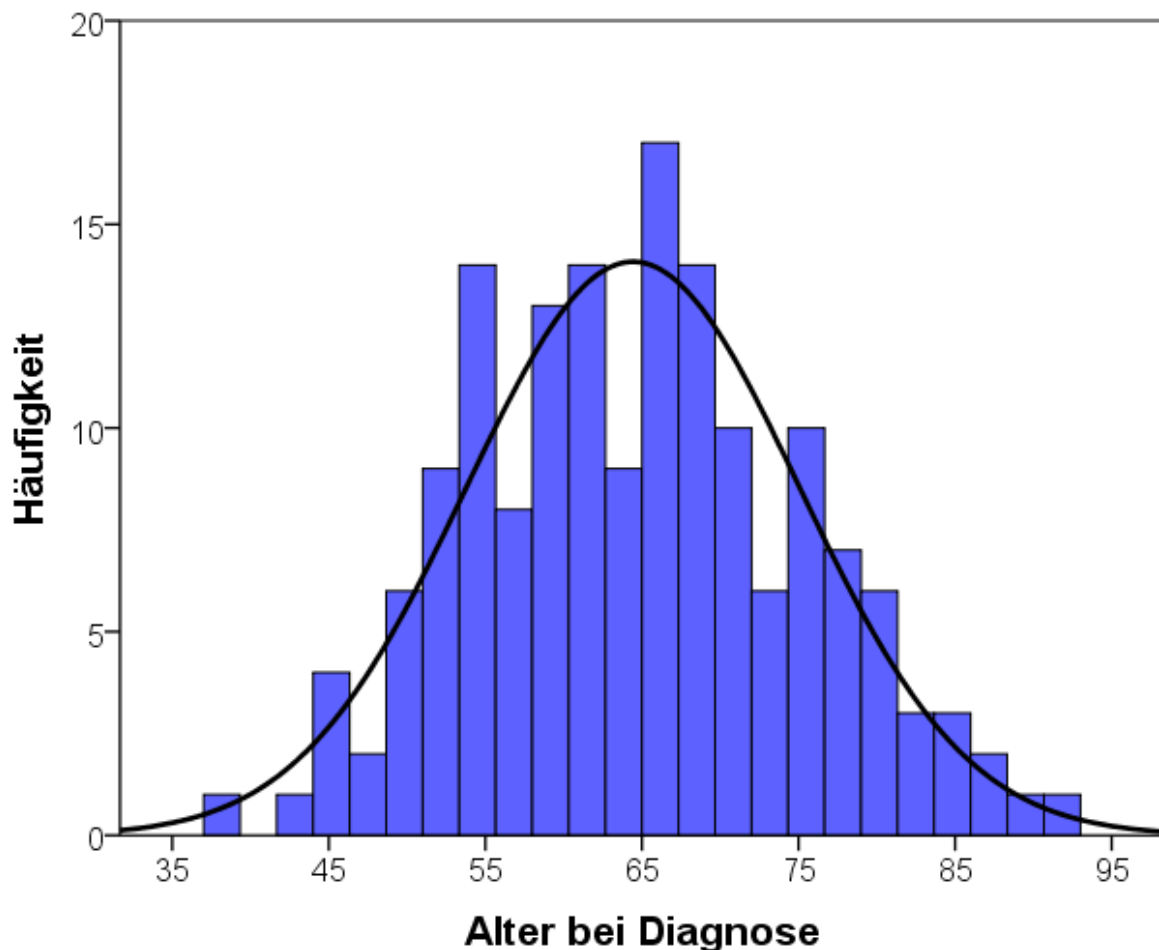


Abbildung 6: Dargestellt ist die Altersverteilung bei Diagnosestellung im Gesamtkollektiv. Die schwarze Kurve stellt die Normalverteilung dar.

4.2 Tumorentität

Von den 161 Patienten wurde bei 78 Patienten ein OSCC und 83 ein OPSCC diagnostiziert.

Die Patienten mit einem OSCC waren bei der Erstdiagnose durchschnittlich 5,2 Jahre älter als die OPSCC-Patienten. Bei Patienten mit OSCC lag das durchschnittliche Diagnosealter bei 67,3 ($\pm 11,8$) Jahren, beim OPSCC war es 61,7 ($\pm 8,6$) Jahre.

Die Lokalisationen des OSCC wurden in 5 Gruppen unterteilt. Diese waren die Schleimhaut von Oberkiefer, Unterkiefer, Wange, sowie Zunge und Mundboden. Die Zunge war mit 22 Fällen (28,2%) am häufigsten betroffen, gefolgt von Mundboden (20 Fälle; 25,6%) und Schleimhaut des Unterkiefers (17 Fälle; 21,8%) und Oberkiefers (9; 11,5%).

Mit Tonsilla palatina, Zungengrund, weicher Gaumen mit Uvula und distalem Oropharynx wurden 4 Gruppen für das OPSCC definiert. Am häufigsten war der Tumor in der Tonsilla palatina lokalisiert. 33,7% (28 Fälle) der OPSCC dieser Studie waren dort zu finden. Die weiteren Lokalisationen waren weicher Gaumen und Uvula mit 24 Fällen (28,9%), Zungengrund (19; 22,9%) und distaler Oropharynx (12; 14,5%).

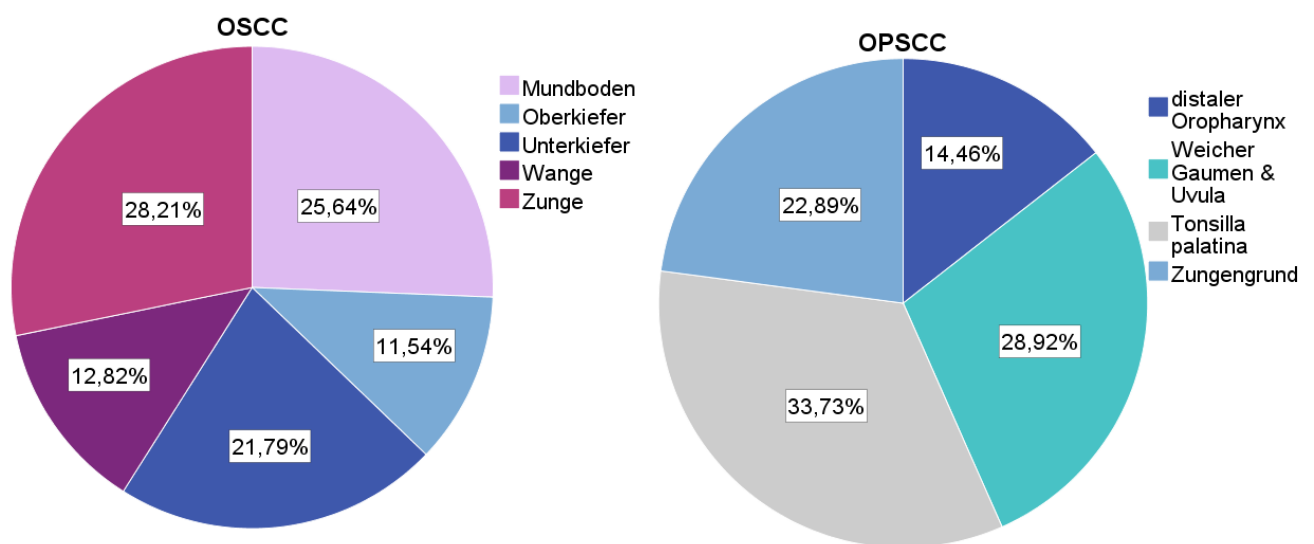


Abbildung 7: Die Lokalisationsverteilung der Tumore innerhalb der beiden untersuchten Entitäten OSCC und OPSCC.

4.3 Risikoverhalten

Das Risikoverhalten der Patienten wurde bezüglich Alkohol- und Nikotinkonsum bewertet. Eine genauere Einschätzung des Konsums der Noxen war retrospektiv nicht möglich. Daher wurde das Verhalten binär mit positiv oder negativ eingeteilt. Im gesamten Kollektiv waren Risikofaktoren stark vertreten. Es waren 87,0% des

Kollektivs mit mindestens einem Risikofaktor behaftet. 12,4% (n=20) gaben an, weder Alkohol zu trinken noch zu Rauchen. In einem Fall ließen sich keine Informationen ermitteln. 72,0% der Patienten waren Raucher, 70,8% gaben an, Alkohol zu trinken. Das männliche Kollektiv zeigte eine höhere Ausprägung der Risikofaktoren. Es fand sich bei 89,9% der Männer und 82,3% der Frauen mindestens ein Risikofaktor.

Im OPSCC-Kollektiv war das Risikoverhalten stärker ausgeprägt als im OSCC-Kollektiv (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,002$). 95,2% der Tumorfälle wiesen eine positive Risikoanamnese auf. Im OSCC-Kollektiv waren es 78,2%. Der größte Unterschied der Kollektive fand sich im Risikofaktor Rauchen. 83,1% der OPSCC hatten eine positive Anamnese, bei OSCC waren es 60,3% (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,002$).

4.4 TNM-Klassifikation, pathologische Eigenschaften

Für eine Einschätzung der Malignität der Tumore wurde die TNM-Klassifikation (7.Auflage) angewandt (s. 2.3.2). Die Bewertung von T (Tumorgröße), N (Lymphknotenbefall) und M (Fernmetastasen) ergab sich aus den standardisierten Befunden des Pathologischen Instituts der Universitätsmedizin Mainz. 67,1% der analysierten Tumore fielen auf die T-Stadien 1 und 2. Der T-Status 2 war mit 37,3% am häufigsten vertreten. Bei 14,3% der Patienten wurde beim Primärtumor das Stadium T4 festgestellt.

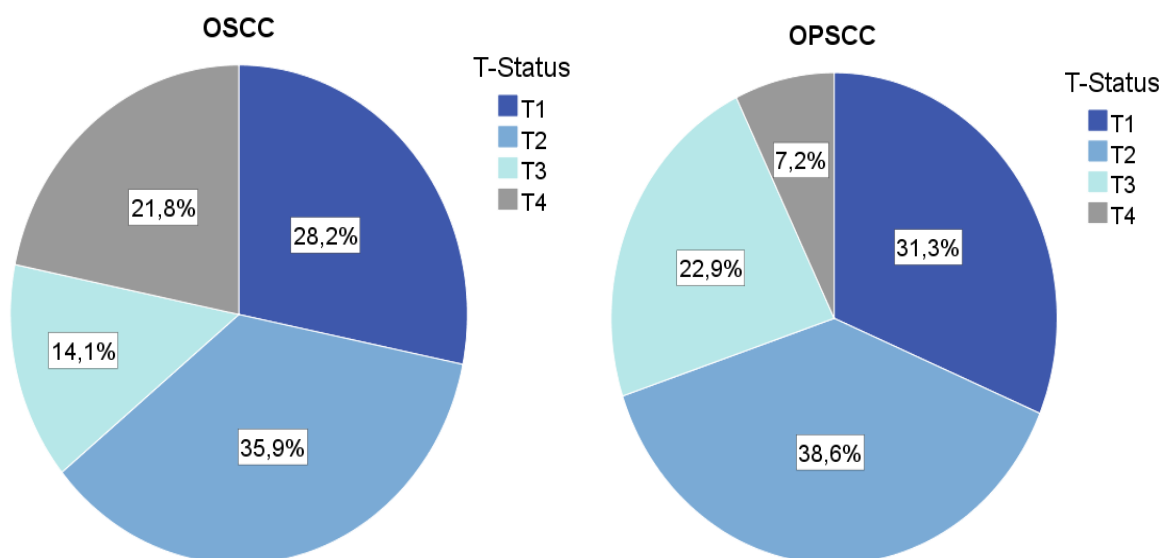


Abbildung 8: Die beiden Tortendiagramme zeigen die Verteilung der T-Stadien innerhalb der jeweiligen Entität.

Insgesamt hatte über die Hälfte des Kollektivs zum Diagnosezeitpunkt einen unauffälligen Lymphknotenstatus. 86 der 161 Patienten wurden von der Pathologie als

N0 eingestuft (53,4%). Bei positiven Lymphknotenbefall (N+) war der N Status 2b mit insgesamt 40,0% der Häufigste.

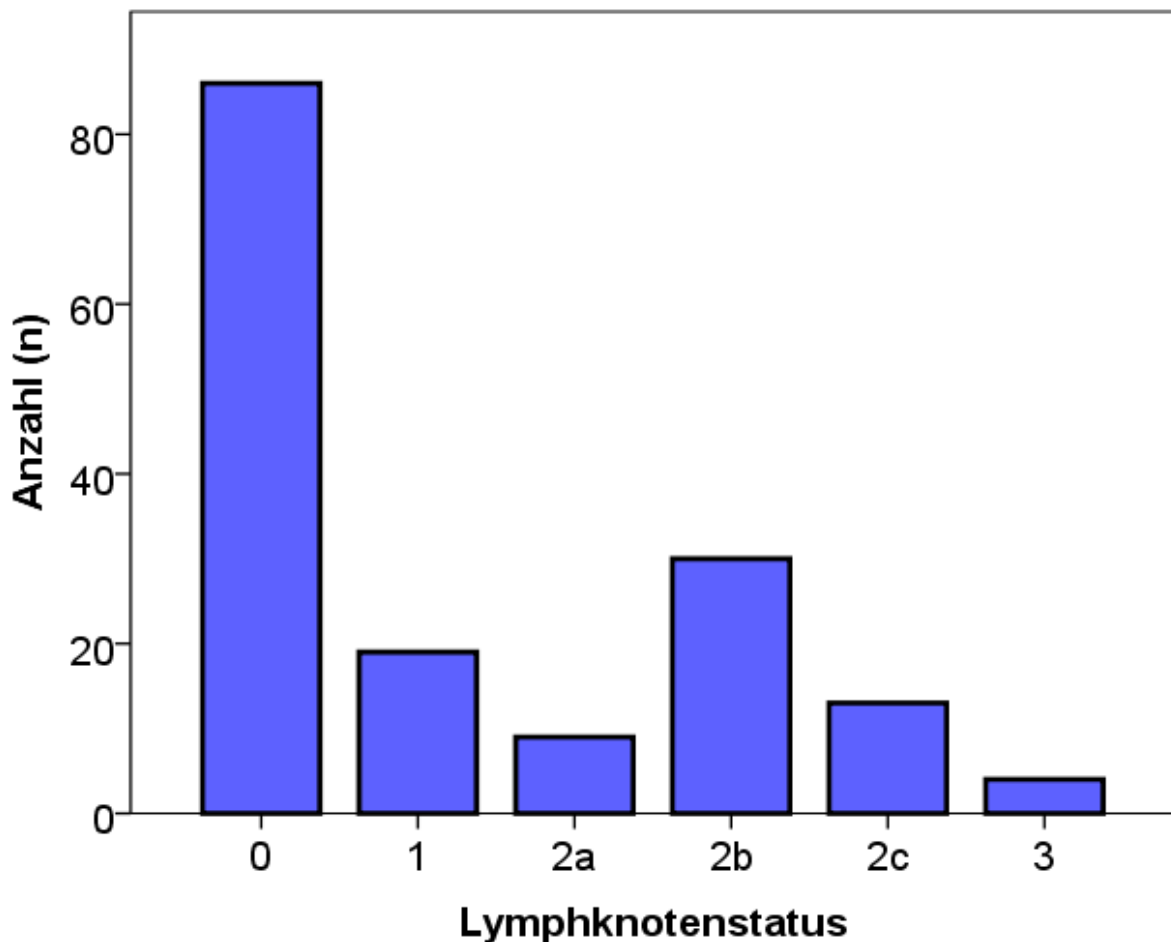


Abbildung 9: Die Balkendiagramme zeigen die Verteilung der N-Stadien.

Ein erhöhter T-Status ging mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Lymphknotenmetastasierung einher. Im Stadium T1 waren zwei Drittel der Fälle frei von Lymphknotenmetastasen, im Stadium 2 noch 58,3%, im Stadium 3 43,3% und im T4-Stadium hatten nur noch 26,1% tumorfreie Lymphknoten. Es zeigte sich ein relevanter Zusammenhang zwischen N+ -Stadium und T3/T4-Status (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,001$).

Im Vergleich der Tumorentitäten waren bei 60,3% der OSCC die Lymphknoten bei Diagnose tumorfrei. Beim OPSCC lag diese Quote niedriger, bei 47,0%. Aus statistischer Sicht betrachtet war der Unterschied zwischen den Entitäten nicht auffällig (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,063$).

In der Analyse zeigte sich, dass ein positiver Lymphknotenstatus nicht häufiger mit einem Rezidiv einherging (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,190$).

Der Tumordifferenzierungsgrad G1-4 konnte in 20 Fällen nicht ermittelt werden. Der Status G2 wurde am häufigsten durch die Pathologie definiert. Er war bei der Hälfte der Patienten (50,3%) vorhanden. Bei insgesamt 7 Patienten lag ein high-grade G4 Tumor vor.

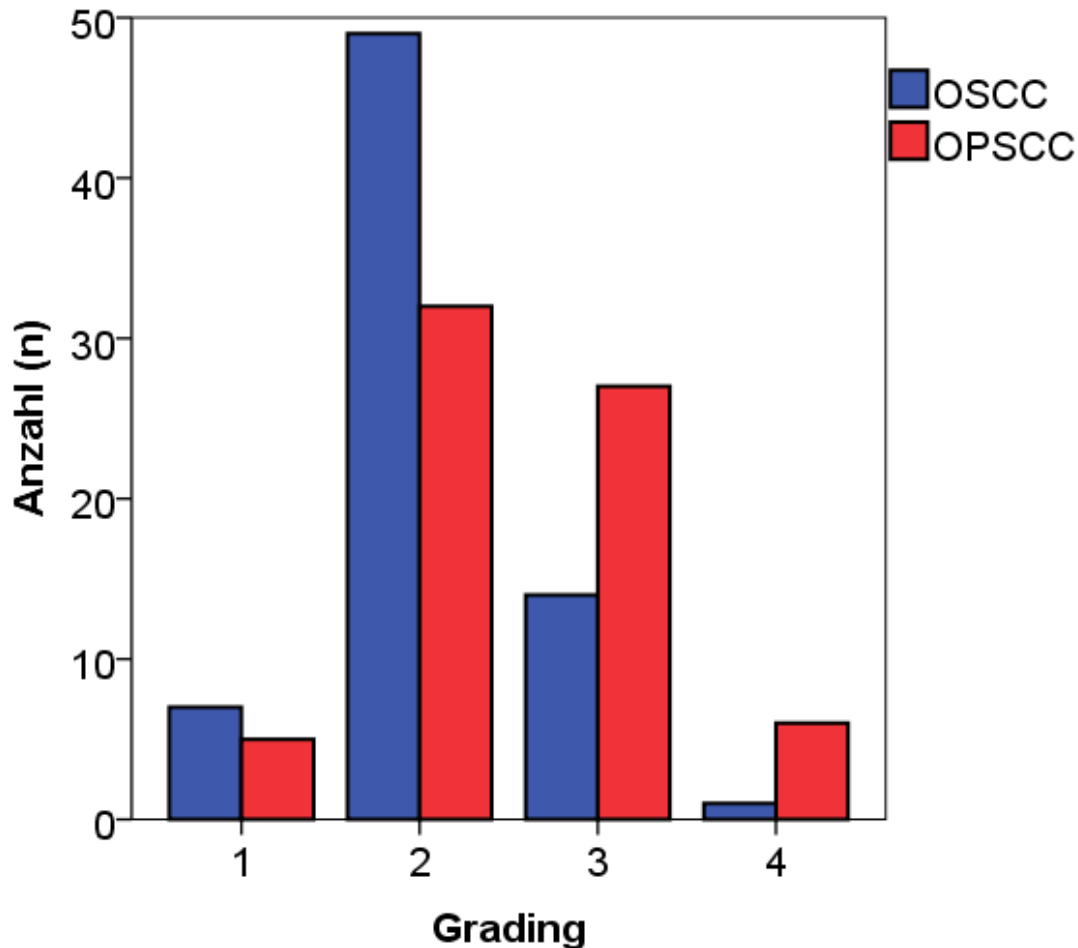


Abbildung 10: Das Balkendiagramm zeigt die Verteilung des Grading (G1-4) aufgeteilt nach den Entitäten anhand der Anzahl der Fälle. Die 20 fehlenden Werte für das Grading wurden in der Grafik nicht berücksichtigt.

4.5 Resektionsstatus

Nach den Angaben der Pathologie wurde in knapp zwei Drittel der Fälle (65,8%) eine R0-Resektion erreicht. 44 Fälle wurden als R1 definiert (27,3%). Bei 11 Fällen wurde keine konkrete Aussage zum Resektionsstatus in der Patientenakte hinterlegt.

Es zeigte sich in der statistischen Analyse kein vermehrtes Auftreten von R1-Status bei fortgeschrittenem Tumorwachstum. Weder ein hoher T-Status noch eine bestehende Lymphknotenmetastasierung zeigten einen Zusammenhang mit einer inkompletten Tumorresektion (Chi-Quadrat nach Pearson: T-Status: $p=0,545$; N-Status: $p=0,832$).

Eine Häufung von Rezidiven bei R1-Patienten wurde nicht festgestellt. 15,8% der R1-Patienten und 20,5% der R0-Patienten erlitten im Beobachtungszeitraum eine Wiederkehr des Tumors (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,405$).

Innerhalb des Kollektivs der OPSCC Patienten fanden die Pathologen deutlich häufiger einen R1-Status als bei den Fällen von OSCC. Mit 38,9% lag diese Quote 18,4% über der Quote der oralen Tumore (20,5% mit R1-Status). Dieser Unterschied stellte sich in der statistischen Analyse als relevant dar (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,011$).

4.6 HPV

Von den 161 Fällen waren 37 (23%) HPV-positiv. 24,2% der Männer waren HPV-positiv und 21% der Frauen (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,390$). Ein Zusammenhang von HPV-Infektion und Lebensalter wurde nicht festgestellt (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,381$).

Es waren mehr oropharyngeale Karzinome p16-positiv. Insgesamt waren 28,9% der OPSCC HPV-positiv gegenüber 16,7% der OSCC. Diese Beobachtung war statistisch relevant (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,048$).

Innerhalb der OPSCC erwies sich die Tonsilla palatina als häufigste Lokalisation von HPV-positiven Tumoren. In 50% (14 von 28) der dort befindlichen Tumore wurde p16 nachgewiesen. Damit zeigte sich eine deutliche Abgrenzung gegenüber den anderen Lokalisationen des OPSCC (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,012$). Bei den OSCC war mit 33,3% der Fälle der prozentuale Anteil an p16-positiven Tumoren bei der Schleimhaut des Oberkiefers am höchsten. Die Ausprägung innerhalb der oralen Tumore zeigte keine statistisch relevanten Unterschiede (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,269$).

4.7 PD-L1-Expression

Für die quantitative und qualitative Auswertung der PD-L1-Expression der Tumore wurden TPS, CPS und Histoscore erhoben.

Bei der Analyse mittels TPS zeigte von allen oralen Plattenepithelkarzinomen kein Tumor gar keine PD-L1-Expression. Der niedrigste Prozentwert für den Anteil an gefärbten Tumorzellen beim OSCC betrug 0,31%. Im Schnitt betrug der TPS 43,6%, der Median lag bei 41,9%. Ein Fall des OPSCC zeigte keine angefärbten Tumorzellen. Der höchste Wert lag bei 98,88%. Die statistischen Tests nach Kolmogorov-Smirnov ($p=0,0$) und Shapiro-Wilk ($p=0,00$) belegten, dass die PD-L1-Expression im Kollektiv nicht normalverteilt war.

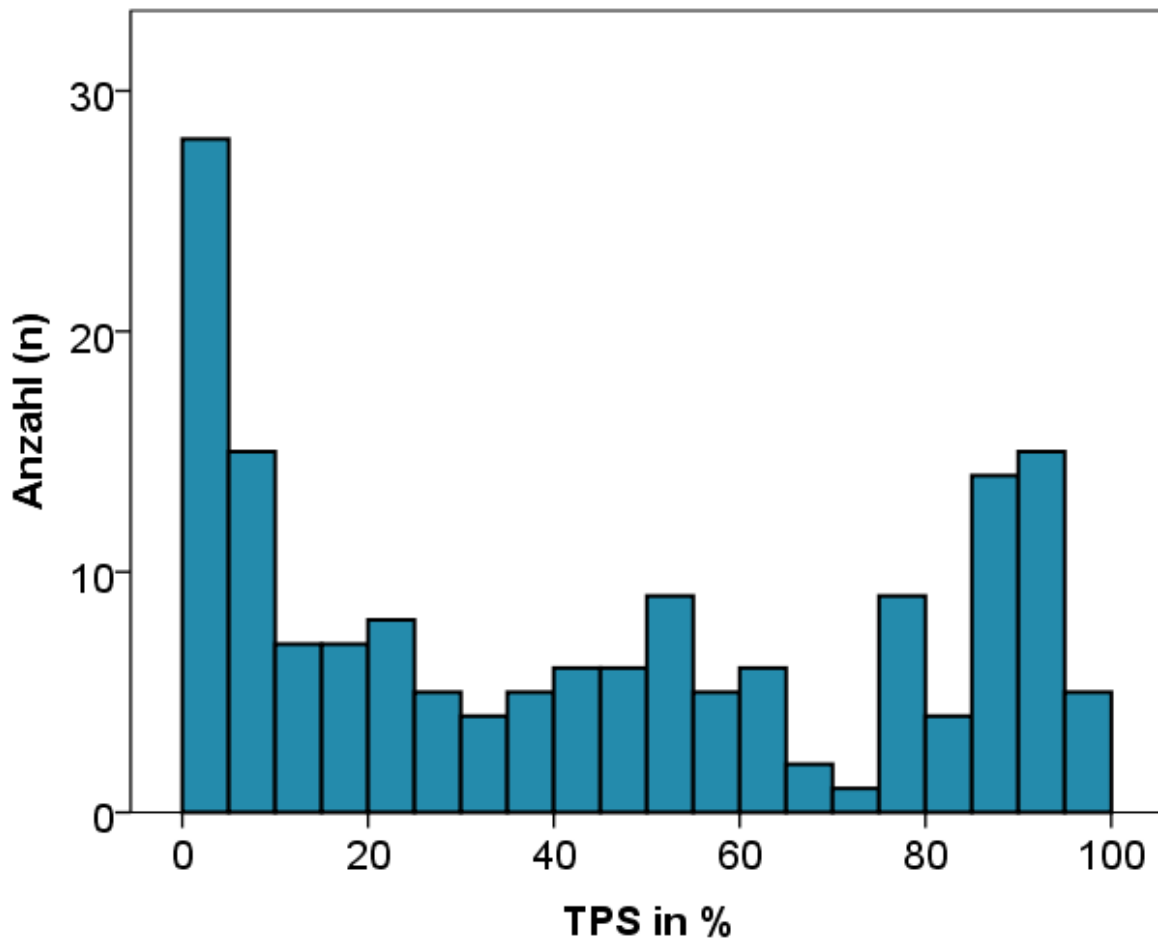


Abbildung 11: Das Balkendiagramm zeigt die PD-L1-Expression bei Betrachtung des gesamten Kollektivs. Aufgetragen ist die Anzahl der Fälle (y-Achse) für den jeweiligen Bereich des TPS (x-Achse).

Der CPS hatte eine Bandbreite von 0,5 als niedrigsten Wert bis zum definierten oberen Wert von maximal 100. Der Mittelwert für das Gesamtkollektiv lag bei 63,35. Anhand der Tests nach Kolmogorov-Smirnov ($p=0,0$) und Shapiro-Wilk ($p=0,00$) konnte gezeigt werden, dass für den CPS keine Normalverteilung vorlag.

Der mittels Software errechnete Histoscore hatte eine Spannweite von minimal 0,2 und 249,76 in maximaler Ausprägung. Der Mittelwert für den Histoscore lag bei 52,9, der Median bei 43,4. Der Histoscore zeigte innerhalb des Kollektivs keine Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test $p:0,000$).

Es zeigte sich keine Assoziation zwischen Geschlechterverteilung und PD-L1-Expression. Der TPS lag im Mittel bei 39,2% für Frauen und bei 46,3% bei Männern. Der CPS ergab für die Männer (83,91) einen höheren Wert als für die Frauen (76,35). Der Histoscore war durchschnittlich beim weiblichen Kollektiv um 1,6 höher (52,3 vs.

53,9). Die Unterschiede waren statistisch nicht relevant (Mann-Whitney-U-Test: TPS: $p=0,119$; CPS: $p=0,317$; Histoscore: $p=0,607$). Zur Analyse des Alters wurde die Grenze von 65 Jahren verwendet und das Kollektiv in zwei Gruppen unterteilt. Der Mittelwert für den TPS für Patienten, die bei Diagnosestellung jünger als 65 Jahre waren bei 43,6%, für das ältere Kollektiv bei 43,5% ($p=0,995$). Auch für den CPS waren die Unterschiede marginal (<65 Jahre: 81,68, >65 Jahre: 80,14, $p=0,835$). Der Histoscore war bei den Jüngeren im Mittel 47,8 und bei den Älteren 59,3. Der Mann-Whitney-U-Test zeigte auch hier keinen statistisch relevanten Zusammenhang von PD-L1 und der Altersstruktur ($p=0,233$).

Es konnte kein Einfluss des Risikoverhaltens auf die PD-L1-Expression nachgewiesen werden. Sowohl unter Betrachtung beider Risikofaktoren (Mann-Whitney-U-Test: TPS: $p=0,543$; CPS: $p=0,726$; Histoscore: $p=0,377$) als auch einzeln zeigte sich weder für Rauchen (Mann-Whitney-U-Test: TPS: $p=0,660$; CPS: $p=0,538$; Histoscore: $p=0,314$) noch für Alkoholkonsum ein Zusammenhang mit PD-L1 (Mann-Whitney-U-Test: TPS: $p=0,723$; CPS= $0,512$; Histoscore: $p=0,729$).

Im Vergleich der Entitäten wies das OSCC eine höhere PD-L1-Expression auf. Der Mittelwert lag bei 47,8% positiven Tumorzellen und damit 8,2% höher als beim OPSCC (39,6%). In der Analyse durch den Mann-Whitney-U-Test zeigte sich kein statistisch relevanter Unterschied für den TPS zwischen den Entitäten ($p=0,159$).

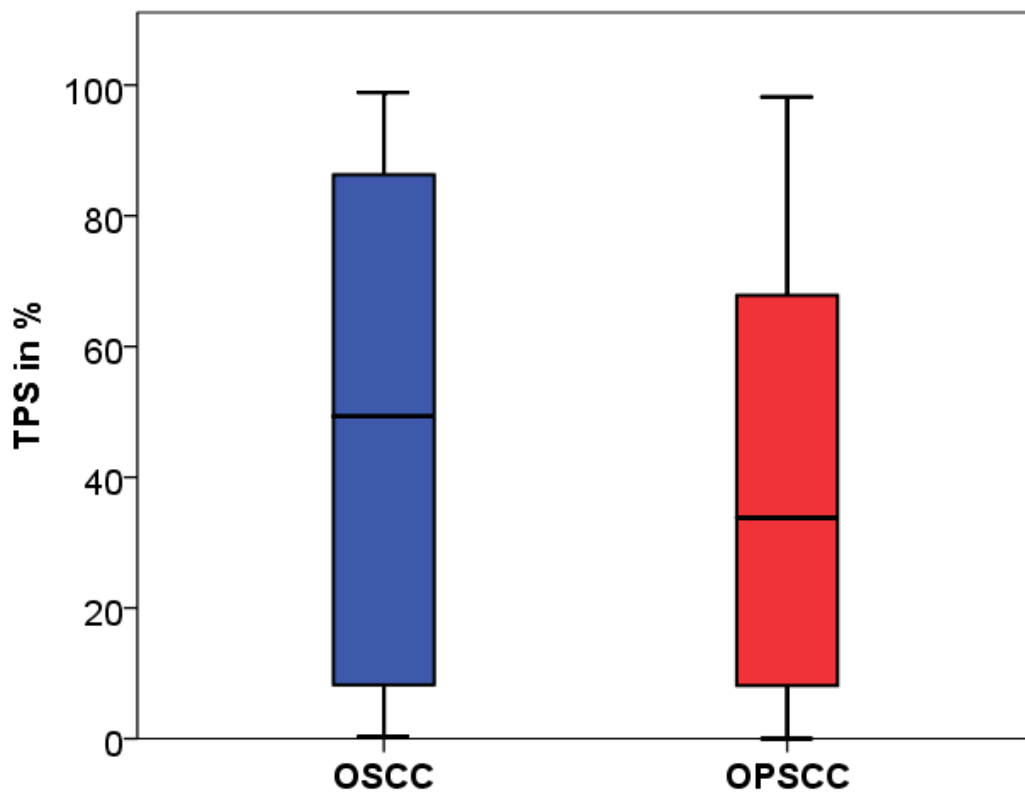


Abbildung 13: Die Boxplots zeigen die Verteilung des TPS im Vergleich der Entitäten OSCC und OPSCC.

Bei Teilung der Kollektive anhand des Medians der PD-L1-Expression (41,9%) lagen 55,6% des OSCC-Kollektivs und 44,4% des OPSCC-Kollektivs oberhalb des Medians. Die Statistik ergab einen relevanten Unterschied zwischen den beiden Entitäten (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,048$). Ein ähnliches Bild ergab sich, wenn man das Kollektiv in zwei Gruppen anhand eines 50% cut-offs der PD-L1-Expression einteilt. Die Hälfte der OSCC Fälle lagen über der 50%-Grenze, 37,3% der OPSCC Fälle. Dieser sichtbare Unterschied zeigte keine statistische Auffälligkeit (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,072$).

Bei Betrachtung des CPS zeigte sich ein um rund 8 Punkte höherer Wert bei den Patienten mit OSCC (70,75) gegenüber denen mit einem OPSCC (62,39). Dieser Unterschied wies keine statistische Relevanz auf (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,078$).

Bei der qualitativen Auswertung der PD-L1-Expression zeigte sich eine intensivere Färbung des OSCC gegenüber dem OPSCC. Der Mittelwert für starke Färbung lag bei 5,5% bei OSCC und 1,1% beim OPSCC, was sich ähnlich für die mittelstarke Färbung

zeigte (14,9% vs. 5,0%). Beide Unterschiede erwiesen sich als statistisch relevant (Mann-Whitney-U-Test: starke Färbung: $p=0,000$; mittelstarke Färbung $p=0,000$).

Dieser Unterschied der Färbeintensität zeigte sich im Histoscore. Der Mittelwert des OSCC lag bei 65,4. Das OPSCC-Kollektiv wies einen Mittelwert von 41,2 vor. Im Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test lag ein statistisch relevanter Unterschied zwischen den Entitäten ($p=0,003$) vor.

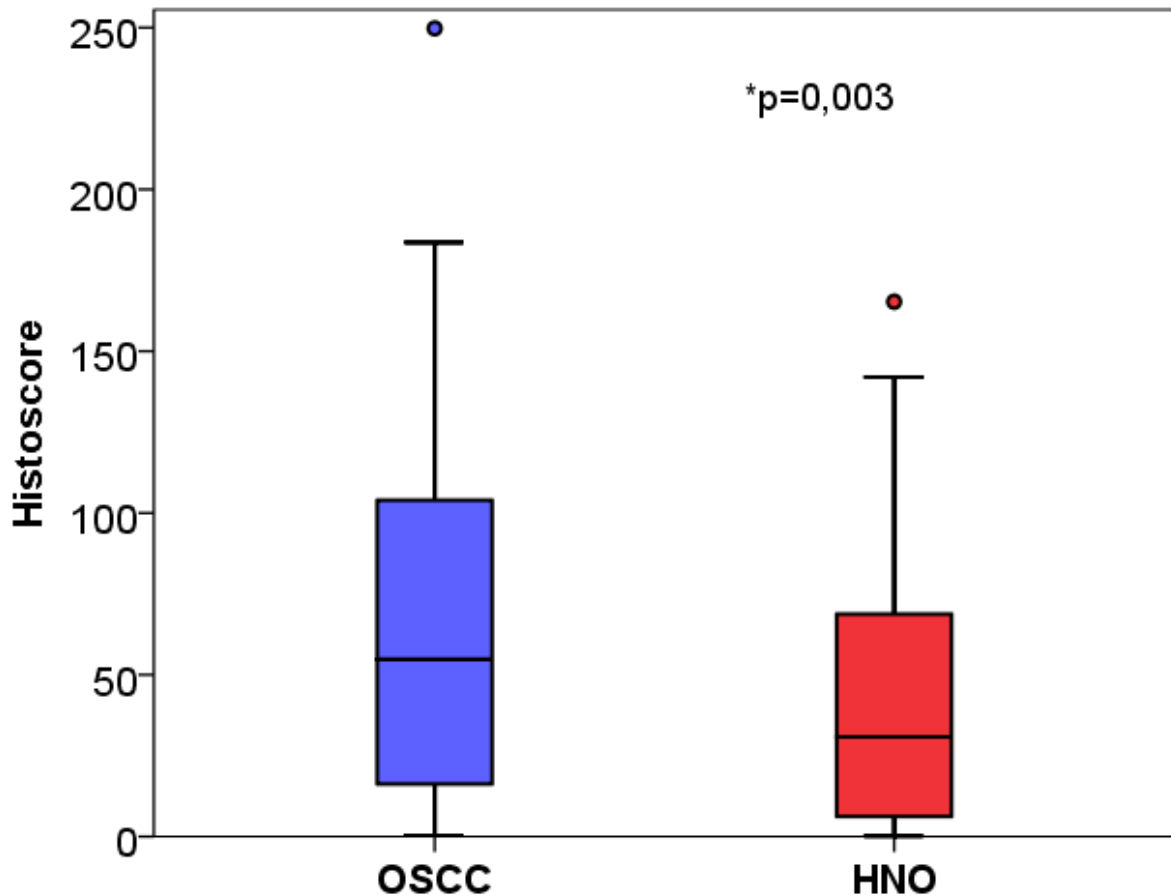


Abbildung 14: Die Boxplots zeigen die Verteilung des Histocores im Vergleich der Entitäten OSCC und OPSCC.

Für die genaue Lokalisation der Tumore konnte beim OSCC kein eindeutiger Zusammenhang mit der PD-L1-Expression beobachtet werden.

Beim OPSCC zeigte sich, dass an der Tonsilla palatina eine vermehrte Expression von PD-L1 vorkommt. Im Vergleich von Tonsilla palatina mit den übrigen OPSCC-Lokalisationen zeigte sich eine vermehrte PD-L1-Expression in den Tonsillen. 57,1% der OPSCC an der Tonsilla palatina lagen oberhalb des PD-L1-Expressionsmedians von 41,9%. Für die anderen Lokalisationen waren es 36,4% oberhalb des Medians. In der statistischen Analyse war dies nicht als relevanter Unterschied nachweisbar (Chi-

Quadrat nach Pearson: $p=0,060$). Die gleiche Beobachtung konnte für den CPS getätigt werden. 57,1% der PECA in den Tonsillen lagen Oberhalb des Medians (82,07) für den CPS. Damit war der Anteil innerhalb der OPSCC ebenfalls am höchsten. Dieser Unterschied zeigte in der statistischen Analyse keine eindeutige Relevanz (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,084$).

Sowohl der Mittelwert für den TPS als auch der Histoscore lag in der Gruppe mit dem T-Status T1 und T2 leicht höher (TPS: 44,5%; CPS: 83,36; Histoscore: 54,4) als bei den fortgeschritteneren Tumorstadien T3 und T4 (TPS: 41,7%; CPS: 76,19; Histoscore: 49,9). Im Mann-Whitney-U-Test waren die Differenzen statistisch nicht relevant (TPS: $p=0,483$; CPS: $p=0,359$; Histoscore: $p=0,429$). Bei Betrachtung der PD-L1-Expression unter Aufteilung nach Medianen für TPS und CPS, sowie Aufteilung des Kollektivs nach T-Status (1/2 vs. 3/4), zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Tumorstatus und PD-L1-Expression (Chi-Quadrat nach Pearson: TPS: $p=0,348$; CPS: $p=0,348$). Bei der Einteilung des Kollektivs in PD-L1-Expression mittels cut-off für den TPS von 50% konnten die statistischen Tests keinen Zusammenhang nachweisen (Chi-Quadrat nach Pearson: $p=0,562$).

Die PD-L1-Expression lag bei Patienten ohne Lymphknotenbefall im Mittel gut 5 Prozentpunkte (46,2% vs. 40,5%) höher als bei Patienten mit einem N+-Status. Der CPS war bei den Tumorfällen ohne Lymphknotenbefall ebenfalls etwas höher als bei Fällen mit Tumornachweis in den Lymphknoten (82,80 vs. 78,93). Demgegenüber stand ein höherer Mittelwert beim Histoscore für Patienten mit infiltrierten Lymphknoten gegenüber den gesunden Lymphknoten (N+: 54,3; N0: 51,7). Weder für den Mittelwert des TPS noch für den Histoscore konnten die Unterschiede statistisch belegt werden (Mann-Whitney-U-Test, TPS: $p=0,382$; CPS: $p=0,599$; Histoscore: $p=0,635$).

Bei Betrachtung von PD-L1 und dem Resektionsstatus konnten keine Zusammenhänge ausfindig gemacht werden. Bei der statistischen Analyse der PD-L1-Expression der Tumorzellen in Relation zum R-Status wurde keine Abhängigkeit beobachtet, ebenso bei Betrachtung des Expressionsmedians (Mann-Whitney-U, TPS: $p=0,440$; CPS: $p=0,243$; Histoscore: $p=0,283$).

Bei der Analyse der PD-L1-Expression im Zusammenhang mit einer HPV-Infektion wurde der TPS zwischen p16+ und p16- Patienten verglichen. Die Mittelwerte für den TPS lagen für p16-negative Patienten bei 43,9% und bei 42,3% für p16-positive Patienten (Mann-Whitney-U, $p=0,844$). In der Analyse des CPS ergaben sich höhere

Werte für Patienten mit einem positiven p16-Status. Für p16-negative Fälle lag der CPS rund 9 Punkte niedriger (p16-: 78,94; p16+: 87,89). Dieser Unterschied zeigte keine statistische Relevanz (Mann-Whitney-U, $p=0,306$). Der Histoscore (p16+: 61,4; p16-: 50,4) wies ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang von p16-Positivität und PD-L1 vor (Mann-Whitney-U, $p=0,319$).

4.8 Überleben

Von den 161 Patienten dieser Studie waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung 87 Patienten verstorben. Das OS lag bei 54,0%. Bis zum Zeitpunkt der Datenauswertung hatten 27 der 161 (16,8%) einbezogenen Patienten ein Rezidiv.

Das DFS des Kollektivs betrug 38,5%. Der mittlere Beobachtungszeitraum war 45,6 Monate.

In der Analyse zeigte sich, dass das Alter einen statistisch relevanten Einfluss auf das OS hatte (Log-Rank: $p=0,006$). Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose älter als 65 Jahre waren, hatten ein rund 75% höheres Risiko zu versterben (Hazard ratio = 1,755). Bei der Analyse des DFS zeigte sich kein statistisch relevanter Einfluss durch das Alter. Während die jüngere Hälfte des Kollektivs durchschnittlich ein DFS von 67,8 Monaten vorwies, galt für den älteren Teil ein Mittel von 49,2 Monaten (Log-Rank: $p=0,104$).

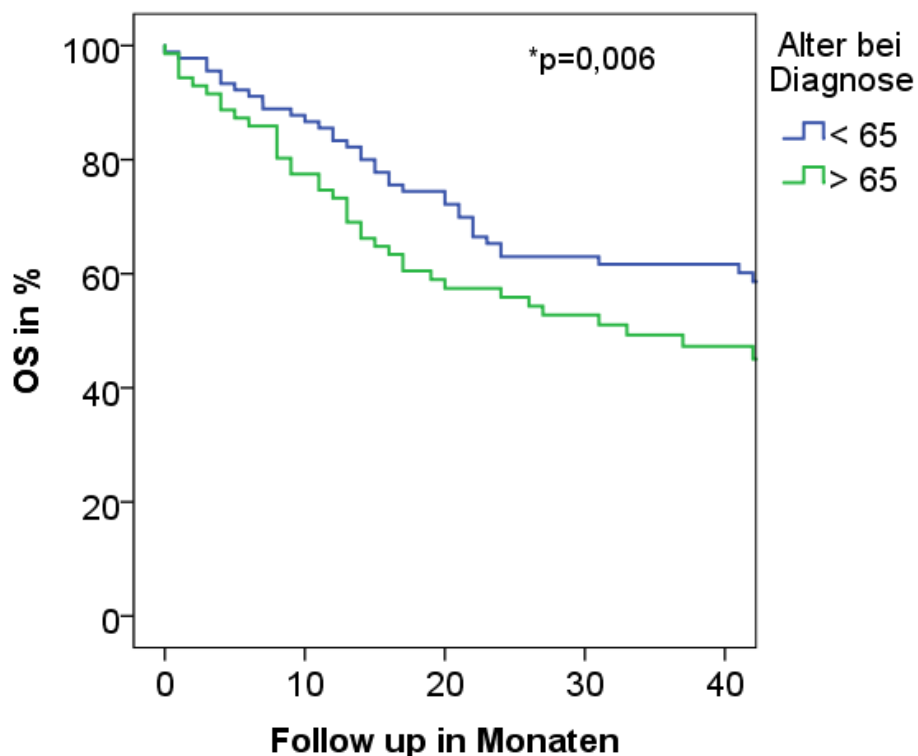


Abbildung 15: Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt das Überleben der zwei Altersgruppen mit Patienten über/unter 65 Jahren bei Diagnosestellung.

Im Vergleich zwischen Patientinnen und Patienten zeigte sich, dass die Männer im Schnitt früher verstarben. Das OS für sie lag bei durchschnittlich bei 64 Monaten. Für Frauen lag der Mittelwert des OS bei 99,2 Monaten. Der Unterschied war statistisch nicht relevant (Log Rank: $p=0,091$). Für das DFS lag der Durchschnitt bei 56,2 Monaten für die Männer und 70,8 Monaten für die Frauen. Dieser Unterschied zeigte keine statistische Relevanz (Log Rank: $p=0,149$).

Die Überlebensrate lag für das OSCC höher als für das OPSCC (OPSCC: 48,7%; OSCC: 59,0%). Dieser Unterschied war statistisch nicht relevant (Log-Rank-Test: $p=0,448$). In der multivariaten Analyse zeigte sich die Entität nicht als Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0,458$).

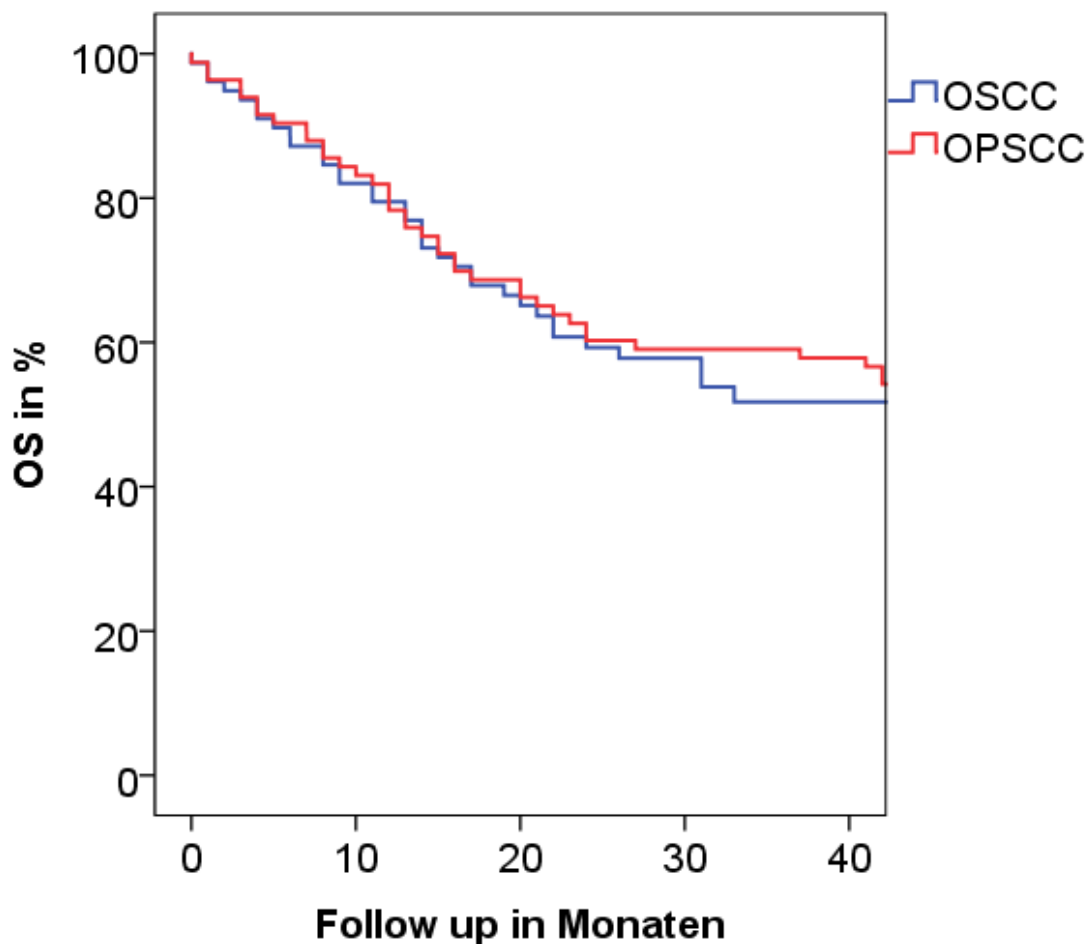


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve des Kollektivs aufgeteilt nach Entität in OSCC (blau) und OPSCC (rot). X-Achse: Follow-up in Monaten, Y-Achse: Survival in %.

Zwei Drittel (66,3%) der OPSCC Patienten zeigten ein Ereignis (Rezidiv und/oder Tod) im beobachteten Zeitraum. Das gleiche galt für 56,4% der OSCC Patienten. Ein relevanter Unterschied zwischen den Entitäten konnte nicht detektiert werden (Log-Rank $p=0,131$).

Im Rahmen der OSCC hatten die Tumore der Zunge im Mittel das längste OS (66,5 Monate). Patienten, bei denen das PECA in der Wange lokalisiert war, starben im Schnitt am frühesten (OS: 27,9 Monate). Die genaue Lokalisation hatte keinen statistisch relevanten Einfluss auf das OS (Log-Rank: $p=0,836$). Bei den oropharyngealen PECA hatten Patienten mit einem Tonsillenkarzinom das durchschnittlich längste OS (105,7 Monate), gefolgt von Tumoren des weichen Gaumens und der Uvula (74,1 Monate). Tumore im distalen Oropharynx hatten den geringsten Mittelwert für das OS (48 Monate). Diese sichtbaren Unterschiede wiesen keine statistische Relevanz vor (Log-Rank $p=0,217$).

Im Vergleich von OSCC und OPSCC zeigten sich unterschiedliche Einflussfaktoren für das Überleben der Patienten. In der nach Entitäten getrennten multivariaten Analyse wurde deutlich, dass Alter und T-Status ausschließlich im Kollektiv der oralen Tumoren einen statistisch relevanten Einfluss auf das OS ausüben. Patienten mit einem OSCC, die bei Diagnose über 65 Jahre alt waren, hatten ein deutlich höheres Risiko zu versterben (HR=3,200, $p=0,002$). OSCC mit einem T-Status von III oder IV hatten ein rund 2,1-fach erhöhtes Risiko (HR=2,054, $p=0,043$). Für OPSCC trafen diese beiden Aspekte nicht zu. Das höhere Alter erhöhte für die oropharyngealen PECA das Risiko um ca. 20% (HR=1,197, $p=0,344$). Der T-Status zeigte für OPSCC keinen statistisch relevanten Einfluss auf die Überlebenschancen. Patienten mit einem T-Status III oder IV hatten ein ca. 8,3% höheres Risiko zu versterben (HR=1,083, $p=0,810$).

In der multivariaten Analyse stellten sich Risikofaktoren nicht als statistisch relevanter Einfluss auf das OS und DFS dar (Cox-Regression: OS: $p=0,666$; DFS: $p=0,335$). Im Log-Rank-Test mit Kaplan-Meier konnte für das OS weder für den Faktor „Rauchen“ ($p=0,873$) noch für den Faktor „Alkohol“ ($p=0,334$) ein relevanter Einfluss detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich beim DFS (Log-Rank: Rauchen $p=0,614$; Alkohol $p=0,792$).

Für die Entitäten einzeln betrachtet konnte kein Einfluss des Risikoverhaltens auf das OS (Log-Rank: OSCC+Risikofaktor $p=0,286$; OPSCC+Risikofaktor $p=0,323$) und DFS (Log-Rank: OSCC+Risikofaktor $p=0,279$; OPSCC+Risikofaktor $p=0,690$) detektiert werden.

In der Analyse mittels Cox-Regression zeigte der T-Status keinen statistisch eindeutigen Einfluss auf das OS ($p=0,086$).

Das durchschnittliche Überleben lag laut Kaplan-Meier-Analyse bei Patienten aus Gruppe 1 (T-Status I und II) im Mittel bei 93,9 Monaten, aus Tumorgruppe 2 (T-Status III und IV) im Mittel bei 54,7 Monaten. Dieser Unterschied durch den T-Status zeigte einen statistisch eindeutigen Einfluss auf das OS (Log Rank: $p=0,018$) und DFS (Log Rank: $p=0,047$).

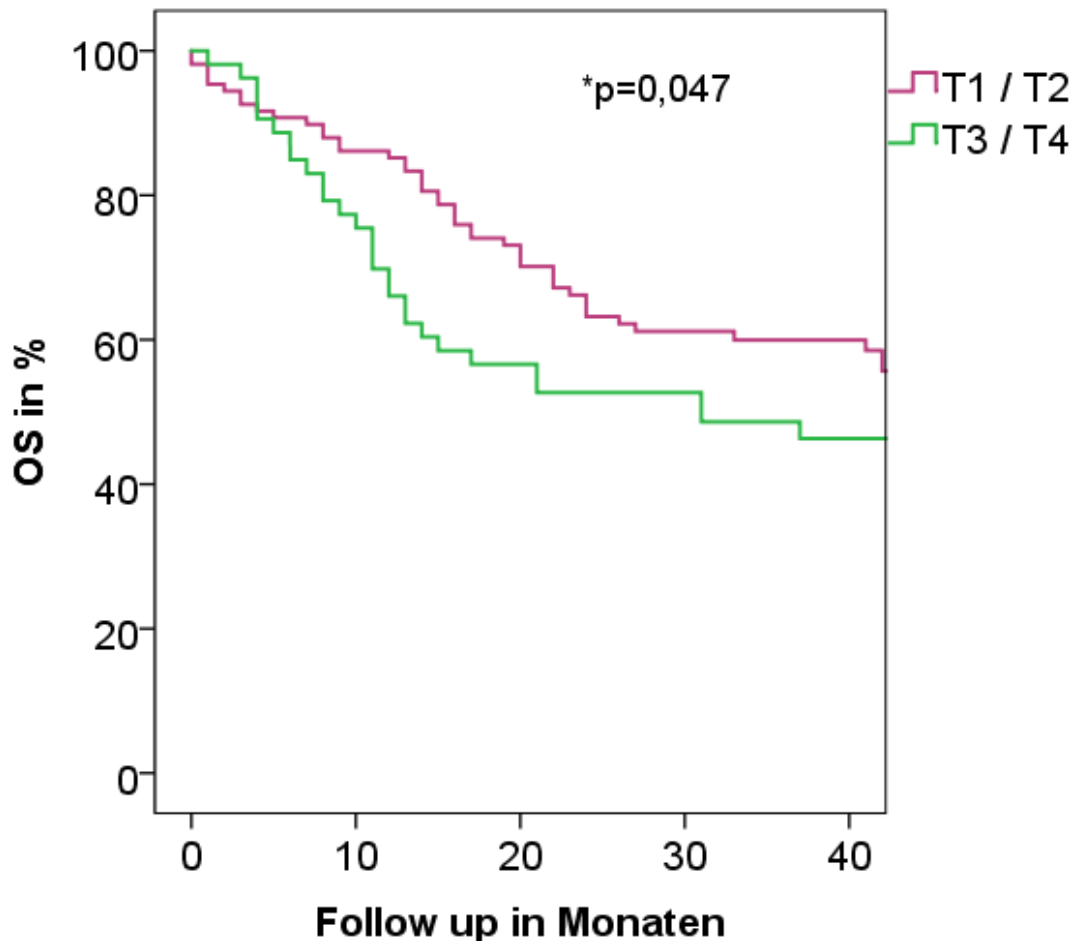


Abbildung 17: Die Grafik zeigt vergleichend die Überlebenskurve für den T-Status, zusammengefasst in zwei Gruppen: Gruppe 1 (T1/T2: violett) und Gruppe 2 (T3/T4: grün).

Bei Betrachtung des Lymphknotenstatus zeigte sich keine eindeutige statistische Relevanz im Einfluss auf das OS (Log-Rank: $p=0,294$). In der multivariaten Analyse bestätigte sich diese Beobachtung ($p=0,579$).

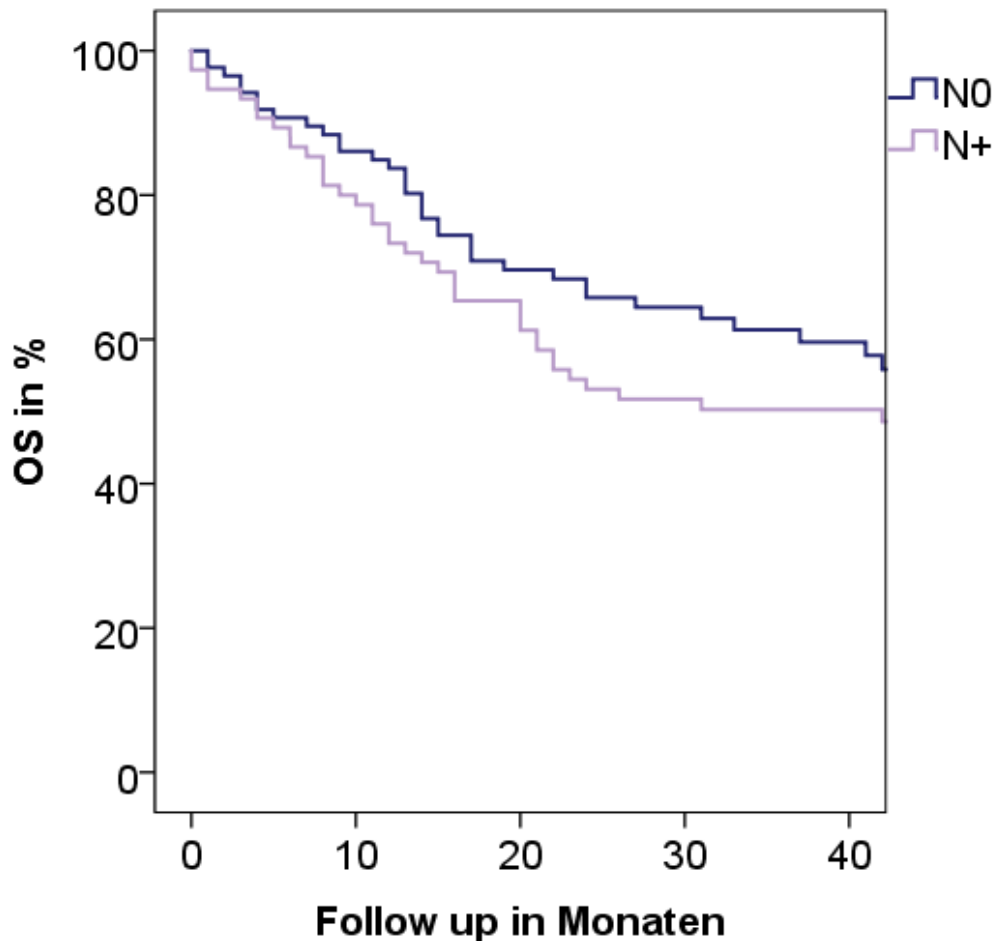


Abbildung 18: Die Grafik zeigt vergleichend die Überlebenskurve für den N-Status, zusammengefasst in zwei Gruppen: N0 und N+.

Der Kaplan-Meier-Schätzer für das OS lag mit 74 Monaten für ein gut differenziertes Tumorigradung (G1,2) deutlich über den 29 Monaten für Tumore mit schlechter Differenzierung (G3,4). Die statistische Analyse zeigte, dass der Differenzierungsgrad der Tumore keinen relevanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit hatte (Log-Rank: OS: $p=0,836$; DFS: $p=0,517$).

Die Kaplan-Meier-Analyse zeigte ein statistisch relevant besseres OS für das R0 Kollektiv (Log-Rank: $p=0,024$). Das OS lag für Patienten mit einer R0 Resektion bei 55,7%, für Patienten mit einer R1 Resektion bei 31,8%. Je länger das Follow-up, desto deutlicher zeigte sich ein Unterschied im OS. Der Unterschied von R0 und R1 bezogen auf das DFS war statistisch nicht nachweisbar (Log-Rank: $p=0,070$).

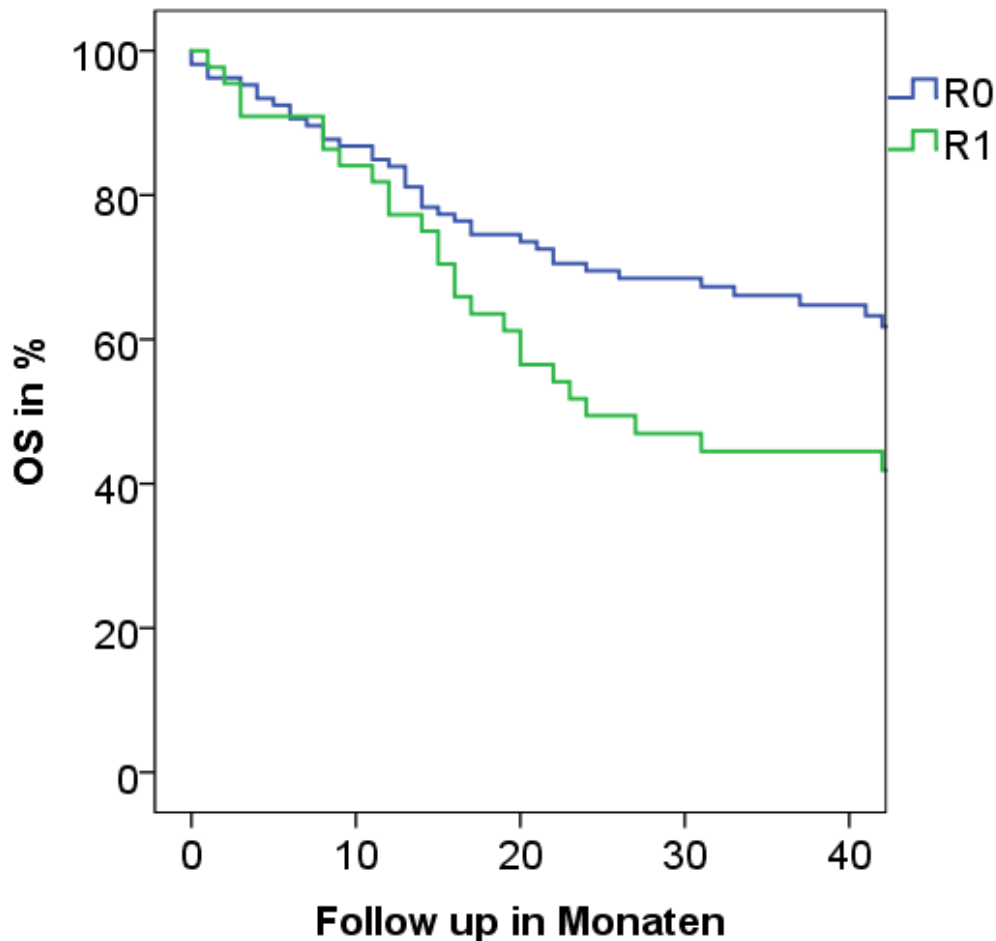


Abbildung 19: Die Grafik zeigt vergleichend die Überlebenskurve für den Resektionsstatus R.

Für das OS zeigte sich, dass p16-positive Patienten im Schnitt länger leben als p16-negative Patienten. 57,3% der negativ getesteten Patienten verstarben im beobachteten Zeitraum, demgegenüber starben 43,2% der positiv getesteten. Dieser sichtbare Unterschied war statistisch nicht nachweisbar (Log-Rank: $p=0,055$). In der Cox-Regression war der Einfluss von HPV auf das Überleben nicht statistisch nachweisbar ($p=0,081$). Für die OPSCC hatte die Infektion mit HPV einen statistisch auffälligen Einfluss auf das Überleben. Das Risiko am Tumor in der beobachteten Zeit zu versterben war fast 60% geringer als bei Patienten ohne HPV-Infektion ($HR=0,404$, $p=0,024$). Bei der multivariaten Analyse unter Betrachtung des DFS zeigten sich keine statistisch eindeutigen Einflüsse.

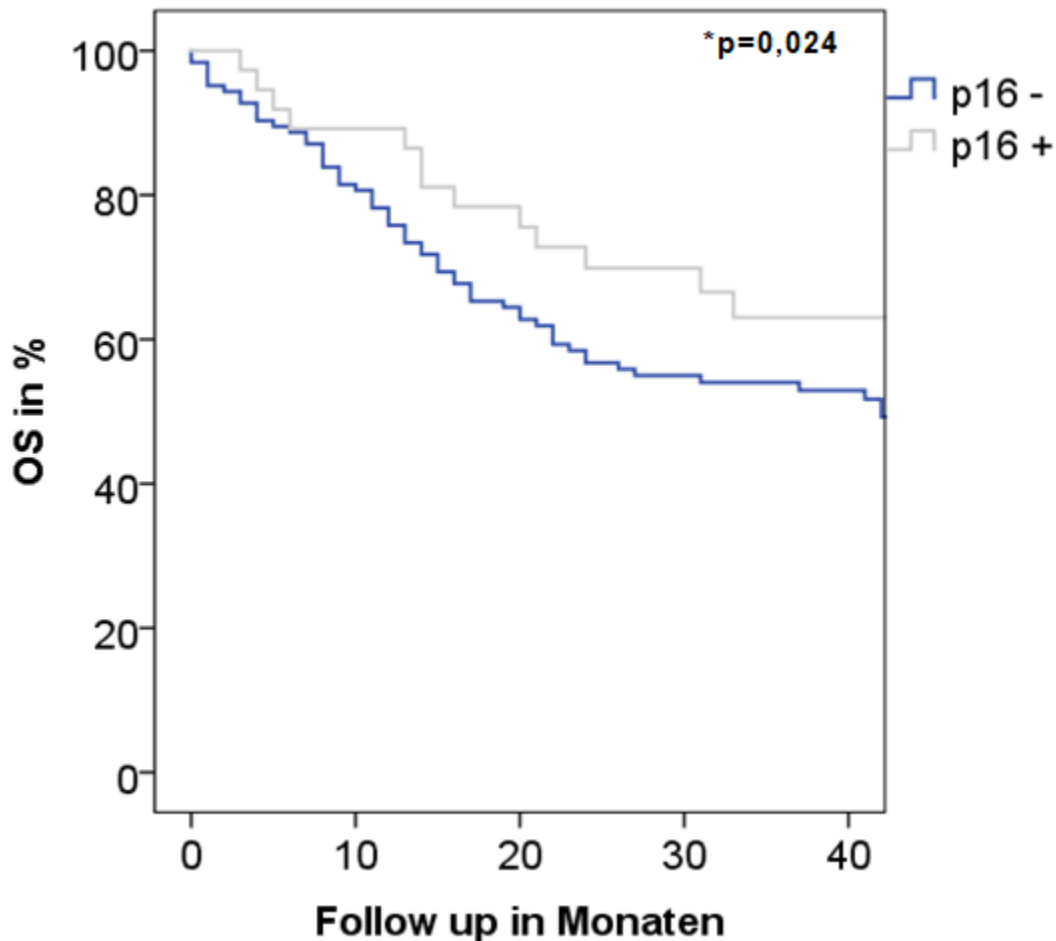


Abbildung 20: Die Grafik zeigt die Überlebenskurve für p16+ und p16- im Vergleich.

Die Analyse der PD-L1-Expression zeigte keinen Einfluss auf das Überleben.

Bei Teilung des Kollektivs anhand eines cut-offs von $\geq 50\%$ PD-L1-Expression lag die Gruppe mit der höheren PD-L1-Expression bei einem OS von 52,9%, die niedrigere Gruppe bei 40,7%. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich beim DFS: 34,9% bei der niedrigeren PD-L1-Expression, 39,8% bei der höheren Expression. Die Unterschiede waren statistisch nicht relevant (Log-Rank-Test: OS: $p=0,191$; DFS: $p=0,193$).

Ähnliche Ergebnisse gab es für andere cut-offs. Bei einer Grenze von $\geq 5\%$ für PD-L1-Positivität lag für die PD-L1-negativen Patienten das OS bei 50,0% und die PD-L1-positiven bei 45,1% (Log-Rank-Test: $p=0,511$). Für den cut-off $\geq 10\%$ lag für die PD-L1-positiven Fälle das OS bei 45,8%, für die PD-L1-negativen Fälle bei 46,5% (Log-Rank-Test: OS: $p=0,729$).

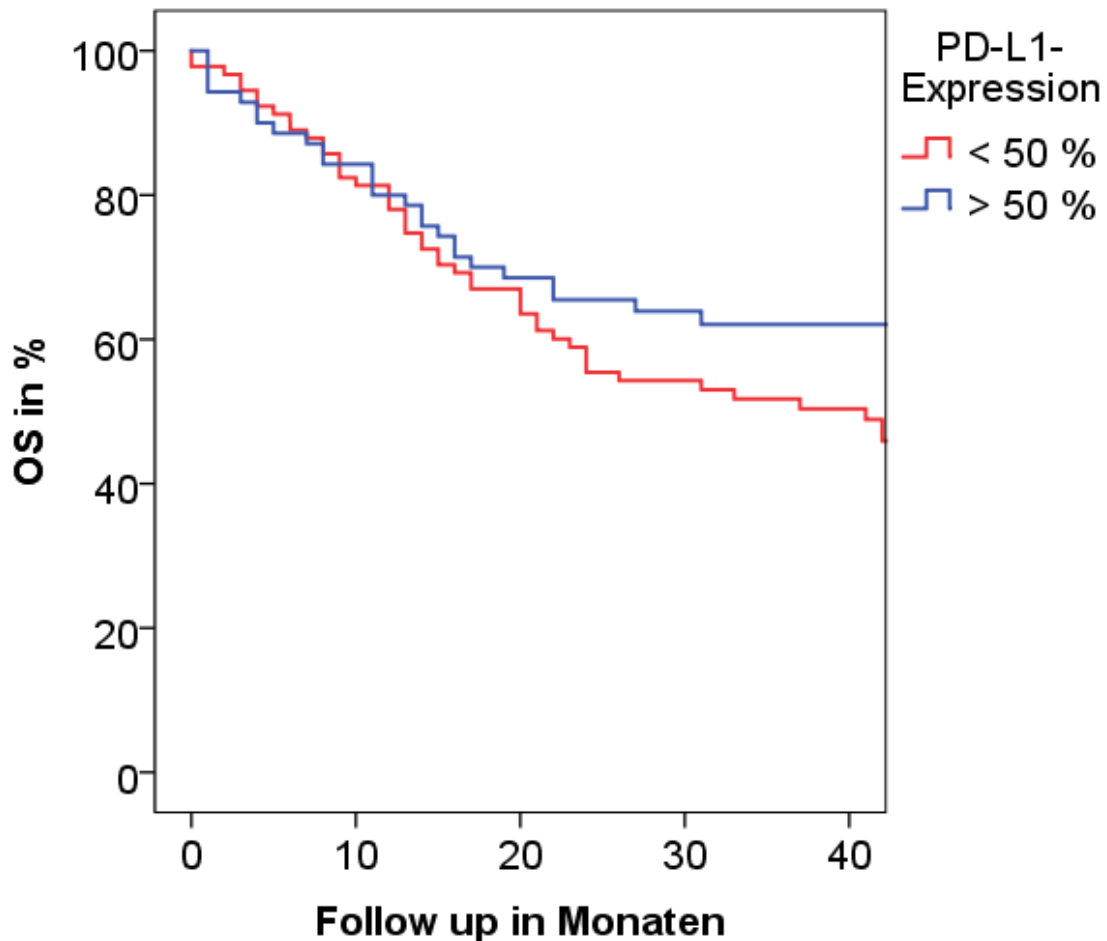


Abbildung 21: Die Grafik zeigt vergleichend die Überlebenskurve für die PD-L1-Expression. Die Gruppen sind aufgeteilt anhand der Expression unterhalb des Medians (42,7% gefärbte Tumorzellen) und oberhalb des Medians.

Die multivariate Analyse zeigte ebenfalls, dass PD-L1 keinen unabhängigen Einflussfaktor für das OS darstellt ($p=0,376$). Auch für das DFS stellte PD-L1 keinen unabhängigen Einflussfaktor dar (Cox-Regression: $p=0,368$).

Diese Tendenz zeigte sich auch in der semiquantitativen Analyse des Histoscore. Teilte man das Kollektiv beim Median des Histoscore (Wert = 43,44) zeigte sich kein Einfluss auf das OS und DFS (Log-Rank: OS: $p=0,357$; DFS: $p=0,180$). Das gleiche zeigte sich bei der Auswertung des CPS (Log-Rank: OS: $p=0,186$; DFS: $p=0,189$).

5 Diskussion

Die medizinischen Fortschritte und verbesserten Lebensumstände haben zu einer deutlichen Erhöhung der Lebenserwartung der Weltbevölkerung geführt (144). Durch Anpassung des Lebensstils, durch Impfungen und frühzeitige Diagnostik lassen sich viele Erkrankungen vermeiden, die früher lebenslimitierend wirkten. Doch je älter die Menschen werden, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit eine Krebserkrankung zu erleiden (145). Somit sieht sich die Medizin einer jährlich wachsenden Zahl behandlungsbedürftiger Tumore gegenüber (3). In den letzten Jahrzehnten wurde das Verständnis der Krebsentstehung immer klarer und detailreicher. Besonders auf molekularer Ebene wurden Entdeckungen getätigt, die verstehen lassen, weshalb sich Tumorzellen erfolgreich gegen das menschliche Immunsystem behaupten können. Die wegweisende Arbeit von Hanahan und Weinberg hat die Weichen für die neuen Pfade in der Tumorthherapie gestellt (33). Deren Erkenntnisse ermöglichten den Paradigmenwandel, der in letzter Zeit in der Tumorthherapie zu beobachten ist (146).

Es wurden innerhalb kurzer Zeit diverse Therapeutika gegen Oberflächenmoleküle, Check-Point-Proteine, Zytokine und viele andere Zielstrukturen entwickelt. Die Behandlungsoptionen gehen weg von den gängigen Chemotherapeutika hin zu einem individuelleren, auf einzelne Patienten zugeschnittenen Therapiekonzept (147). Es konnten in Folge solcher Studien bereits einige antikörperbasierte Therapieschemata etabliert werden. Durch die Erfolge in der Tumorthherapie mit PD-1- und PD-L1-Antikörpern, in erster Linie beim NSCLC, rückte dieser Angriffspunkt in den Fokus. Für die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches dauert diese Entwicklung noch an. Man hofft, mit neuen Therapieansätzen die unbefriedigende 5-JÜR von ca. 50% steigern zu können (148).

Die Rolle von PD-L1 für das Outcome der Patienten mit OPSCC oder OSCC wird in aktuellen Studien diskutiert. Um gezielt wissenschaftliche Fortschritte tätigen zu können, muss eine einheitliche Sprache in der Forschung gefunden werden. Was ist die Definition von PD-L1-Positivität? Welchen Einfluss hat die Wahl des Antikörpers auf das Ergebnis? Diese Fragen im Rahmen dieser Arbeit diskutiert.

5.1 Das Kollektiv

Die im Vorfeld der Studie durchgeführte Schätzung der Fallzahl ergab, dass eine Kollektivgröße von 150-200 zielführend und praktikabel ist. Gleichzeitig wurde in dieser Studie mit 78 OSCC Patienten und 83 OPSCC ein ausgewogenes Verhältnis der beiden Entitäten für eine hohe Vergleichbarkeit gewährleistet. Da es sich um eine retrospektive

Arbeit handelt, gab es keinen persönlichen Patientenkontakt. Somit ließ sich aus den Patientenakten keine quantitative Aussage zum Risikoverhalten treffen. Deshalb wurden Alkohol- und Tabakkonsum lediglich als binäre Merkmale ausgewertet. Es war keine weitere Differenzierung möglich.

Für einen Großteil der Patienten stellt die Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich eine deutliche Verkürzung der Lebenszeit dar. Im Kollektiv dieser Studie überlebten im Schnitt 78,9% der Patienten das erste Jahr nach Diagnosestellung. Nach zwei Jahren lebten noch 59,8% und nach 5 Jahren 50,6%. Damit waren die Ergebnisse kongruent zu den durchschnittlichen Überlebensdaten diverser Studien (9, 108).

Die Daten des Deutschen Zentrums für Krebsregisterdaten gaben für Tumore der Mundhöhle und des Rachens (C00-C14) detaillierte Überlebensraten für die Jahre 2015-2016 an. Die Frauen lagen bei einer 1-JÜR von 81%, 2-JÜR von 71%, 3-JÜR von 65% und 5-JÜR von 56%. Die Männer lagen bei allen Zahlen tiefer. Sie weisen eine 1-JÜR von 74%, 2-JÜR von 60%, 3-JÜR von 54% und 5-JÜR von 42% vor. Die Zahlen der vorliegenden Studie für die Patientinnen lagen sehr nahe an den Daten aus dem Krebsregister. Daraus lässt sich ableiten, dass diese Studie das Gesamtkollektiv der Tumorpatienten gut repräsentiert.

Insgesamt lag das OS im untersuchten Kollektiv leicht über dem Durchschnitt des Krebsregisters. 54,0% der Patienten dieser Studie lebten nach 5 Jahren noch, während es im Bundesschnitt lediglich 42% waren. Für diesen Unterschied gilt es mehrere Punkte in Betracht zu ziehen. Zum einen wurden im Rahmen dieser Studie Patienten mit einem bereits metastasierten PECA ausgeschlossen. Patienten mit einer nachgewiesenen Fernmetastasierung haben eine deutlich schlechtere Prognose und ein stark vermindertes OS (11).

Ein weiterer Grund für die besseren Überlebenszeiten im Kollektiv dieser Studie kann die Behandlung und Nachsorge in einem Zentrum für Kopf-Hals-Tumore, wie es die Universitätsmedizin Mainz darstellt, sein. Durch die Zertifizierung der Deutschen Krebsgesellschaft wird ein hoher Standard in Diagnostik, Behandlung und Nachsorge bestätigt. Bundesweit werden nicht sämtliche Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom in einem zertifizierten Zentrum behandelt und erfasst. Dadurch kann es zu verzögerter Diagnostik und Therapie kommen, welche einen negativen Einfluss auf die Lebenszeit ausüben kann.

Die Verteilung der Geschlechter gestaltet sich in der gesamten Studienlandschaft weitestgehend ähnlich. In den Studien sind mehr männliche Patienten vom OSCC und OPSCC betroffen. In dieser Studie lag mit 61,5% auf Seiten der Männer ebenfalls ein

Ungleichgewicht vor. In der Studie von Zhang et al. mit 510 Patienten nahmen die Männer 74% der Fälle ein, bei der Keynote 012 Studie von Seiwert et al. machten Männer 84% (149), bei Kim et al. 90% des Kollektivs aus (150). Nach Daten der IARC (International Agency for research on cancer) liegt weltweit das Verhältnis von Frau und Mann auf Seiten der Männer. Im World Cancer Report 2020 wird ein Verhältnis von 2:1 für orale Tumore und 5:1 für pharyngeale (ausgenommen Nasopharynx) Tumore berichtet (3). In dieser Studie war der Anteil der Männer ebenfalls höher bei den oropharyngealen Tumoren (57,7% beim OSCC vs. 65,1% beim OPSCC). Jedoch war innerhalb dieser Studie der Unterschied nicht so deutlich, wie es sich im weltweiten Vergleich darstellt. Erklärbar ist dies durch ein ähnlicheres Risikoverhalten von Mann und Frau im analysierten Kollektiv im Gegensatz zum weltweiten Vergleich (4, 58).

Insgesamt lag im Patientenkollektiv der Konsum von tumorfördernden Substanzen deutlich über dem Bundesschnitt. In dieser Studie waren 72,0% positiv für eine Nikotinanamnese. Demgegenüber waren nach Mikrozensus 2017 in Rheinland-Pfalz 78,2% der Personen Nichtraucher (151). Dass Männer ein höheres Risikoverhalten haben, wurde auch in dieser Studie deutlich. Nur 10,1% der eingeschlossenen Männer gaben an weder zu rauchen noch Alkohol zu trinken. Bei den Frauen waren es 17,7%. Durch eine Kumulation tumorfördernder Noxen lässt sich das frühere und vermehrte Auftreten der Tumore bei Männern begründen. Insgesamt erkrankten Männer in Deutschland 3 Jahre früher als Frauen an einem Tumor im Mund-Rachen-Bereich (4). Laut Deutschem Krebsregister zeigt sich ein relevanter Anstieg an Kopf-Hals-Tumoren bei Frauen erst ab dem 50. Lebensjahr. Bei den Männern hingegen lässt sich bereits ab dem 40. Lebensjahr ein deutlicher Anstieg der Inzidenz beobachten. Das Maximum findet sich in der Gruppe der 60- bis 64-Jährigen. Dort lag die Inzidenzrate bei 42,6 Fälle pro 100.00 Einwohner (152).

Das mittlere Alter zum Diagnosezeitpunkt war in dieser Studie 64,4 Jahre. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen des Robert-Koch-Instituts, welches die höchste Inzidenz in der Altersgruppe 60-64 Jahre beobachtet (152).

Die Analyse des Kollektivs zeigte ein ungewöhnliches Übergewicht von frühen Tumorstadien. In vielen Fällen haben die Patienten in den frühen Phasen der Krebserkrankung keine Beschwerden und die Tumore bleiben lange Zeit unentdeckt. Regelmäßig werden zwei Drittel der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs in T-Stadium III/IV erstmalig entdeckt (96). In der vorliegenden Arbeit befanden sich zwei Drittel (67,1%) der detektierten Metaplasien im T-Stadium I oder II. Diese Beobachtung kann durch den Ausschluss von Patienten mit vorliegenden Fernmetastasen mitbegründet werden. Studien haben gezeigt, dass besonders bei fortgeschrittenen

Tumoren mit höherem T-Stadium Fernmetastasen zu finden sind (153). Dieser Faktor könnte ebenfalls dazu beitragen, dass innerhalb dieser Studie das OS im Vergleich zu den Daten des Krebsregisters höher lag (101).

Im Rahmen dieser Studie konnte kein statistisch relevanter Einfluss von tumorbefallenen Lymphknoten auf das OS nachgewiesen werden. Ursächlich für diese unterschiedlichen Ergebnisse kann der hohe Anteil an früh entdeckten Tumoren im Rahmen dieser Studie sein. Daher ist möglicherweise in vielen Fällen kein Lymphknotenbefall vorliegend oder nachweisbar (tumorfremde Lymphknoten in 53,4% der Fälle). Andere Studien zeigten deutlich häufiger bereits vorliegende Lymphknotenmetastasen. So wiesen bei Müller et al. bereits 62,2% der Tumore einen Lymphknotenbefall vor (154). Bei Balermipas et al. waren 77% im N-Status 2 oder 3 (155). Eine weitere Ursache konnte das gesamte Metastasierungsverhalten der Tumore sein. Durch das Studiendesign war der Ausschluss von Patienten mit einem M1-Status festgelegt und viele weit fortgeschrittene Tumore wurden ausgeschlossen, die mutmaßlich den Anteil der N+-Tumore erhöht hätten. In der Studie von Chen et al. wurden ebenfalls nur M0-Patienten eingeschlossen. Mit 46,2% N0-Status im Kollektiv liegen die Werte ähnlich zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie. Ebenfalls wurde in der Studie kein unmittelbarer Einfluss von einem positiven Lymphknotenstatus auf das OS gesehen. Allerdings ermittelten Chen et al. einen Quotienten aus positiven Lymphknoten von allen entfernten Lymphknoten. Dieser Quotient ging bei hohen Werten mit einer statistisch schlechteren Prognose für das OS einher (149).

Der Einfluss des Tumorgradings auf OS und DFS ist Diskussionsgegenstand in der Wissenschaft. Die S3-Leitlinie zum Mundhöhlenkarzinom formuliert einen schlechteren Differenzierungsgrad als definitiv prognostisch negativen Faktor (13). Dem gegenüber spricht die S3-Leitlinie zum Larynxkarzinom dem Tumorgrading eine geringe, nicht sicher belegte, Einflussnahme auf das DFS und OS der Patienten zu (156). In der Arbeit von Janecka-Widla et al. konnte für das OPSCC ein statistisch besseres DFS bei besser differenzierten Karzinomen beobachtet werden. Für das OS konnte dies nicht gezeigt werden (157). Im Rahmen der vorliegenden Studie stellte das Tumorgrading keinen signifikanten Faktor für ein verringertes OS oder DFS dar. In der Studie von Oliveira-Costa, die sich mit PD-L1-Expression bei OSCC befasst, konnte ebenfalls kein statistisch relevanter Unterschied von schlecht differenziertem zu gut differenziertem Tumorgewebe auf das Überleben gefunden werden (158). Demgegenüber existieren mehrere Studien, die einen eindeutigen Einfluss des Gradings auf die Lebenserwartung des Patienten nachweisen. Koo et al. konnten in ihrer Studie belegen, dass es bei höherem Grading, also schlechterem Differenzierungsgrad, zu vermehrten

kontralateralen Lymphknotenmetastasierungen kommt (159). Dieses Metastasierungsmuster geht mit einer schlechteren Prognose einher und wird daher auch in der Tumorklassifikation berücksichtigt (s. 2.3.2).

Es erscheint folgerichtig, dass schlechter differenzierte Karzinome mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Dennoch sind, wie es auch die zögerliche Formulierung in der Leitlinie zum Larynxkarzinom belegt, weitere Studien notwendig, um Klarheit und Aussagekraft zu erbringen.

5.2 Material und Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumore von 161 Patienten untersucht. Zur Analyse der PD-L1-Expression wurde das Verfahren der Immunhistochemie durchgeführt. Die Erstellung der Tumorschnitte, der Färbungen, der TMAs und der Antikörperweis erfolgte nach definierten Standards des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

In dieser Studie wurde der Antikörper anti-PD-L1 rabbit antibody EPR19759 (Abcam, Berlin, Deutschland) verwendet. Er ist im Institut für Pathologie etabliert und wird standardisiert für die PD-L1-Färbungen genutzt.

Welche Rolle die Wahl der Antikörper für das Ergebnis der PD-L1-Expression spielt, ist nicht ganz klar. Der in mehreren Studien genutzte Antikörper PD-L1 (E1L3N®) XP® zeigte bei Leduc et al. lediglich 9,5% PD-L1-positive HNSCC bei einem cut-off $\geq 5\%$ (160). Hanna et al. definierten mit dem gleichen Antikörper rund 69% der HNSCC als positiv bei einem cut-off $\geq 5\%$ und 36% als positiv bei einem cut-off $\geq 50\%$ (161).

In der Blueprint Studie von Hirsch et al. wurden vier verschiedene PD-L1 Assays (22C3, 28-8, SP142, and SP26) an NSCLC-Gewebe getestet. Es zeigte sich, dass SP142 weniger Zellen färbte als die anderen Antikörper (162). Eine Beobachtung, die durch die Arbeit von Ilie et al. ebenfalls getätigt wurde (163). Zwischen den anderen Antikörpern konnten keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden. Der Antikörper, der in dieser Studie verwendet wurde, ist bisher nicht in Vergleichsstudien untersucht worden. Dass es Unterschiede der Färbung und somit auch des Ergebnisses gibt, wurde durch die genannten Studien belegt. Dies ist ein Punkt, der beachtet werden sollte, wenn die ermittelten Zahlen interpretiert werden. Aktuell ist in den USA von der FDA das 22C3 Assay zugelassen, um die PD-L1-Expression zu ermitteln. Durch diese Methode wird der Einsatz von Pembrolizumab zur Therapie des NSCLC entschieden (164). Solche Standards sind von hoher Wichtigkeit für das Erschaffen von vergleichbaren Ergebnissen.

Es gibt unterschiedliche Arten für die Auswertung der Antikörperfärbungen. Meist wird die Analyse durch zwei oder mehrere Pathologen durchgeführt (154, 165). In dieser Studie wurde die Analyse computerunterstützt mit dem Halo Programm ausgeführt. Diese Methode der Auswertung beinhaltet, analog zu der mikroskopischen Auswertung durch Pathologen, eine subjektive Komponente, da das Programm manuell durch die Auswertende Person angepasst wird.

Nur wenige andere veröffentlichte Studien setzten ebenfalls computergestützte Verfahren ein (166). Lee et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass es eine hohe Übereinstimmung von computerbasierten Analyseverfahren und der manuellen Zählung durch erfahrene Pathologen gibt (167). Diese computerbasierte Methode stellt für die Zukunft eine interessante Option dar. Durch die technische Entwicklung werden die Programme immer genauer. Komplexere Scores, wie beispielsweise der Histoscore, können in kurzer Zeit erhoben werden. Es können im Klinikalltag mit Hilfe des Computers viel Zeit und menschliche Ressourcen gespart werden. Der Computer ermöglicht eine automatisierte, teils objektive Analyse und ist somit in den Gütekriterien Validität, Objektivität und Reliabilität dem Menschen überlegen (168). Es wird wichtig sein zu beobachten, ob innerhalb der eingesetzten Geräte und Softwares unterschiedliche Ergebnisse errechnet werden. Dazu sind Studien nötig, die dies vergleichen.

Der HPV-Status wurde in dieser Studie durch IHC ermittelt. Die membranäre Färbung wurde durch das Halo-Programm ausgewertet. Somit liegt hier, wie für die Auswertung der PD-L1-Expression, eine Abhängigkeit vom Untersucher vor (s.o.). Als Goldstandard für den Nachweis einer HPV-Infektion gilt die PCR mit dem Nachweis von mRNA. Bei dieser Methode ist die Objektivität im Vergleich zur IHC höher. Dennoch gilt die IHC laut Studienlage als sehr sensitive, kostengünstige Methode, um eine Infektion mit dem Hochrisikotyp p16 zu belegen (169). In aktuellen Studien werden unkomplizierte Schnelltests, die den HPV-Status über venöses Blut bestimmen können, getestet (110). Dieses Verfahren stellt eine hoffnungsvolle, gering invasive Option für die Zukunft dar.

5.3 Scoringsysteme und Grenzwerte

Derzeit wird die Frage, ob ein Tumor PD-L1 positiv oder negativ ist, sehr unterschiedlich beantwortet. Es gibt viele Grenzwerte, die genutzt werden. Diese cut-offs beziehen sich in der Regel auf den TPS. Dieser gibt den prozentualen Anteil der PD-L1 positiven Tumorzellen an.

Einige Arbeiten bezeichnen einen Tumor als PD-L1 positiv sobald mehr als 0% der Zellen eine Färbung durch PD-L1-Antikörper aufweisen (170, 171). Wählt man diesen

cut-off >0% in der vorliegenden Studie, hätte lediglich ein PD-L1 negativer Tumor vorgelegen. Diese Abgrenzung (>0%) erscheint für eine Trennung von Positivität und Negativität nicht sinnvoll.

Andere Studien nutzen als Grenzwerte einen TPS >1% (149), >5%(172), >10% (173) oder >20% (150). Bei der Studie von Garon et al., die sich mit dem NSCLC auseinandersetzt, werden Tumore als PD-L1-positiv eingestuft, wenn der TPS einen Wert $\geq 50\%$ ergibt (165). Die gleiche Grenze wird auch von Cohen et al. bei PECA des Kopf-Hals-Bereiches verwendet (174). Durch diese unterschiedlichen Grenzwerte ergeben sich extreme Schwankungen der PD-L1-Expression zwischen den Studien für HNSCC. Während manche Studien 9,5% der OPSCC und OSCC als positiv detektieren (160), zeigen andere Arbeiten mit bis zu 94% eine massive Ausprägung von PD-L1 (175).

Um einen idealen Grenzwert zu ermitteln, wird im Rahmen der medizinischen Testung häufig die Receiver operating characteristics (ROC) Kurve zusammen mit dem Youden-Index genutzt. Diese stellen statistische Mittel dar, mit welchen man eine sinnvolle Entscheidung über Grenzwerte für medizinische Testungen treffen kann. Es wird eine Abwägung von Sensitivität und Spezifität getroffen und ein Grenzwert festgelegt mit dem zwei Gruppen unterschieden werden können (176, 177). Mit Hilfe dieser Berechnungen haben Garon et al. in ihrer Studie zum Einsatz von Pembrolizumab beim NSCLC einen Youden-Index von 45-50 errechnet und in Folge dessen einen cut-off von 50% für die PD-L1-Expression festgelegt. Entscheidend für die Berechnung dieses Grenzwertes war der Endpunkt der Studie, das Ansprechen auf die Therapie mit Pembrolizumab (165).

Für die hier vorliegende Studie konnten ROC und Youden-Index nicht angewendet werden, da kein eindeutiger Einfluss durch die PD-L1-Expression belegt werden konnte. Für diese mathematischen Analysen ist eine klare Trennung in schlechte Prognose gegen gute Prognose oder krank gegen gesund notwendig, um anhand dieser binären Trennung einen Grenzwert mit dem Youden-Index zu ermitteln. Dieser könnte anschließend die Gruppen sinnvoll in PD-L1-positiv und -negativ unterscheiden. Da der prognostische Wert von PD-L1 jedoch nicht eindeutig belegt ist (s. 5.4) kann kein Grenzwert auf dieser wissenschaftlichen Basis errechnet werden.

Viele Studien geben die PD-L1-Expression als ein binäres Merkmal pos./neg. (0/1) an (160). Die anderen Arbeiten stellen die Positivität semiquantitativ ordinal 0-3 dar. Diese Methodik wurde im Cologne Score von Scheel et al. im Zusammenhang mit PD-L1 und NSCLC weitergeführt (s. 3.2.8) (141).

Der Cologne Score erweist sich in dieser Studie als unbrauchbar. Der höchste Wert ist auf eine Expression von 75% begrenzt. Somit liegen innerhalb dieser Studie 29,2% aller Fälle außerhalb des vorgegebenen Wertebereichs.

Ein weiteres Scoringsystem stellt der Immune Cell Score (IC) dar. Der IC gibt den prozentualen Anteil der mittels Antikörper gefärbten Immunzellen im Tumorgewebe an (178). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die Immunzellen nicht ausgewertet und folglich kein IC ermittelt.

Eine Kombination aus TPS und IC ist der Combined Positive Score (CPS). Dieser addiert den Teil der PD-L1-positiven Tumorzellen plus positiven Immunzellen. Er wird in Prozent, anteilig an allen Tumorzellen, angegeben. Dazu wurde der Quotient aus positiven Zellen (Tumor- und Immunzellen) durch alle Tumorzellen geteilt und mit 100 multipliziert. Bei Lilja-Fischer et al. wird dieser CPS genutzt. Sie definieren PD-L1-Positivität mit einem $CPS \geq 1$ (179). In der Studie von Kulangara et al. zeigt der CPS eine genauere Vorhersagekraft gegenüber dem TPS in Bezug auf das Ansprechen der Therapie mit Pembrolizumab (164).

In der Keynote-040-Studie von Cohen et al. wird die Wirksamkeit von Pembrolizumab bei PD-L1-positiven HNSCC beobachtet. Die Studie kommt zu dem Ergebnis, dass eine höhere Effektivität des PD-1-Inhibitors bei einem $TPS \geq 50\%$ und einem $CPS \geq 1$ vorliegt (180). Im Zuge dessen hat man sich im Konsensuspapier der Society for Immunotherapy of Cancer bei Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches auf einen cut-off für den $CPS \geq 1$ geeinigt. Als am besten geeignetes Scoringsystem wird im Konsensuspapier der CPS angesehen (174).

Im Gegensatz zu TPS und CPS steht der Histoscore. Dieser bezieht die Intensität der immunohistochemischen Anfärbung mit ein. Eine stärkere Färbung ergibt einen höheren Score (181). Er enthält im Gegensatz zu TPS und CPS sowohl qualitative als auch quantitative Informationen (s.3.2.8).

In dieser Studie war die schwache Färbeintensität dominierend. Nur auf einem geringen Teil der Tumorzellen wurde eine starke Membranfärbung detektiert. Diese Ergebnisse decken sich mit der Studie von Kim et al. (150). In beiden Arbeiten ist die schwache Färbeintensität dominierend, die starke Intensität ist auf wenigen Tumorzellen exprimiert. Eine der wenigen weiteren existierenden Studien, die den Histoscore nutzt, ist die Studie von Chovanec et al. zu Hodentumoren. In dieser wurde das Kollektiv bei einem cut-off von 150 für den Histoscore in zwei Gruppen geteilt (182). Diese Grenze erscheint nachvollziehbar, da der Wertebereich von 0-300 in der Mitte geteilt wird. Anhand dieser Einteilung lagen im hier analysierten Kollektiv 6 Fälle oberhalb von 150 und 155 unterhalb der durch Chovanec et al. definierten Grenze. Dieser Grenzwert

bringt somit keine Trennschärfe. Ein sinnvoller Grenzwert für Histoscore im Zusammenhang mit HNSCC muss durch weitere Studien ermittelt werden.

Mit Hilfe des Histoscores konnte im Rahmen der hier vorliegenden Studie der in der PD-L1-Expression bestehende Unterschied der Entitäten OSCC und OPSCC deutlicher herausgearbeitet und statistisch belegt werden ($p=0,003$). In dieser Studie zeigte sich im Vergleich der Mittelwerte für den Histoscore eine relevant höhere PD-L1-Expression bei OSCC gegenüber OPSCC (65,4 vs. 41,2). Dies macht deutlich, dass durch die Beachtung der Färbeintensität sich existierende Unterschiede, die vorher nicht beachtet wurden, herausgearbeitet werden können.

Auf Grund der immunmodulatorischen Wirkung (s. 2.1.3) erscheint es logisch, dass eine höhere Ausprägung von PD-L1 auf Tumorzellen einen Einfluss auf die Immunreaktion hat. Somit erscheint es auch nachvollziehbar, dass nicht nur der Anteil der PD-L1-positiven Tumorzellen von Bedeutung ist, sondern auch die Ausprägung auf einer Zelle. Diese spiegelt sich in der Intensität der immunhistochemischen Färbung wider. Die Bewertung dieser Intensität findet bei der Auswertung mittels Histoscore Beachtung. Zum heutigen Zeitpunkt findet sich in der Studienlandschaft keine eindeutige Aussage, ob die Färbeintensität eine Bedeutung für den Einfluss von PD-L1 hat. Auch die vorliegende Studie kann in dieser Richtung keine weitergehenden Hinweise geben. Bei Müller et al. wird die Färbeintensität subjektiv, durch zwei unabhängige Pathologen, in schwach und stark unterteilt. Sie sehen in ihrer Studie einen Zusammenhang von starker PD-L1-Expression und aggressiver wachsenden Tumoren (154). Dieser Aspekt sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Auf Grund der unklaren Bedeutung der Färbeintensität kann man aktuell keine Aussage treffen, dass der Histoscore aussagekräftiger ist als der TPS. Für die Zukunft ist davon auszugehen, dass durch den verstärkten Einsatz computerbasierter IHC Auswertung vermehrt Studien veröffentlicht werden, die den Histoscore errechnen.

Es gibt in der Literatur Studien, die individuelle Scores festlegen, um ihre jeweiligen Kollektive nach PD-L1-Expression aufzuteilen. De Meulenaere et al. kategorisierten ihre Ergebnisse der IHC von 0-3 (183). Diese Einteilung ist von 0-2 analog zum Cologne Score. Unter dem IHC score von 3 summieren sich alle Tumore mit einem TPS von $>10\%$. Bei Yearly et al. wird die Expression in einer Intensität von 0-5 durch die analysierenden Pathologen bestimmt (184). Diese eigens erstellten Einteilungen sind spezifisch auf die Studie zugeschnitten, in der sie veröffentlicht werden. Daher passen sie gut, um die eigenen Ergebnisse zu klassifizieren, haben jedoch wenig Vorteile in Hinblick auf die Vergleichbarkeit der aktuellen Studienlage.

5.4 PD-L1 als prognostischer Marker

Das Zusammenspiel von PD-1 und PD-L1 hat eine immunregulierende Wirkung auf den menschlichen Organismus. Welche Bedeutung der Nachweis von PD-L1 auf Tumorzellen hat, ist noch nicht abschließend geklärt. Unterschiedliche Beobachtungen konnten in Studien getätigt werden. Auf Grund des Wirkmechanismus der PD-1/PD-L1-Achse (siehe 2.3.2) erwartet man per se ein schlechteres OS bei erhöhter PD-L1-Expression. Die Analysen von OS und DFS ergaben, dass die PD-L1-Expression in dieser Studie keinen statistisch relevanten Einfluss hatte. Weder eine sehr hohe noch eine sehr niedrige Ausprägung von PD-L1 können als prognostischer Faktor herangezogen werden. Es zeigte sich in dieser Studie die Tendenz, dass Patienten mit einer höheren PD-L1-Expression etwas länger leben. Der Unterschied war statistisch nicht relevant und somit konnte keine belastbare Aussage dahingehend getroffen werden.

In der Analyse der Studienlandschaft ergab sich ein gemischtes Bild. Manche Studien sehen in einer gehobenen PD-L1-Expression einen eindeutig positiven prognostischen Faktor. Bei Ahn et al. wurde starke PD-L1-Expression als statistisch signifikanter unabhängiger Marker für ein verlängertes OS gesehen (185). Die gleiche Beobachtung tätigten auch Hanna et al. in ihrer Studie (161). Kogashiwa et al. sahen in ihrer Studie zu fortgeschrittenen OSCC ein signifikant besseres DFS und OS bei PD-L1-positiven (cut-off: $\geq 5\%$) Tumoren (186).

Dem entgegengesetzt gibt es mehrere Studien, die in einem verstärkten Vorkommen von PD-L1 bei Tumorzellen einen Faktor für ein verkürztes Überleben sehen. In der Studie von Müller et al. wurde eine starke Korrelation zwischen hoher PD-L1-Expression und einer verkürzten Lebenszeit beobachtet. In ihren jeweils verglichenen Kohorten lebten die Patienten mit einer geringeren PD-L1-Ausprägung im Schnitt rund doppelt so lange, wie Patienten mit starker Expression. PD-L1-Expression wurde in der genannten Studie als stärkster prognostischer Faktor für das Outcome gesehen, stärker als der T-, N-, M-Status oder das Grading (154). Maruse et al. beschrieben in ihrem Kollektiv einen statistisch signifikanten Unterschied für die 5-JÜR zwischen PD-L1 negativen (91%) und PD-L1 positiven (69%) Patienten (187). Auch die Studie von de Vicente et al. sah PD-L1 als negativen Faktor für das OS beim OSCC. Sie erkannten bei einem TPS $>10\%$ einen Unterschied im Bezug auf das OS und legten daher diesen Wert als cut-off fest (188). Demgegenüber stehen mehrere Studien, die diesen Effekt von PD-L1 bei OSCC und OPSCC nicht bestätigen können. Sowohl bei Kim et al. (150) als auch Karpathiou et al. zeigten sich Tendenzen, die vergleichbar mit dieser Studie

sind (189). Vermehrte PD-L1-Expression ging in allen Arbeiten mit einem etwas verbesserten OS einher, ohne statistisch signifikant zu sein.

Eine allgemein gültige Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse liegt noch nicht vor. Ein Erklärungsansatz für das leicht verbesserte OS könnte nach der Studie von Taube et al. sein, dass eine hohe PD-L1-Expression in der Regel in einem Tumormilieu vorliegt, das reich an Immunzellen ist. Diese an unterschiedlichen Tumorentitäten durchgeführte Studie zeigt, dass auf den eingewanderten Lymphozyten und Makrophagen, die in der Tumorumgebung zu finden sind, ebenfalls PD-L1 exprimiert wird (190). Somit ergibt sich eine hohe PD-L1-Konzentration in einem Tumor der vom Immunsystem aktiv bekämpft wird.

Ein weiterer Erklärungsansatz stellt eine Verbindung zu CD8 her. Kogashiwa et al. beobachteten ein vermehrtes Auftreten von CD8+-Lymphozyten bei erhöhter PD-L1-Expression. CD8 wurde dabei eine tumorsupprimierende Wirkung zugesprochen (186). Generell wurde PD-L1 besonders auf Immunzellen nachgewiesen (s. 2.3.2). Daher wird der Ansatz diskutiert, dass eine hohe lokale Expression von PD-L1 durch eine Immunreaktion des Körpers verursacht wird (191). Dies sind jedoch nur Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien. Weitere Arbeiten werden nötig sein, dies genauer zu beleuchten.

Interessanterweise zeigte sich im Rahmen der hier durchgeführten Studie, dass PD-L1 bei Patienten mit einem N0-Status durchschnittlich höher ausgeprägt war, jedoch der Histoscore bei Patienten mit einem positiven Lymphknotenbefall größer war (s.4.7). Die jeweiligen Unterschiede waren statistisch nicht eindeutig. Dennoch ist es eine spannende Beobachtung, dass der Marker PD-L1, der assoziiert mit Immunzellen ist, ein intensiveres Expressionsmuster zeigt, wenn die Lymphknoten als Schaltstellen des Immunsystems vom Tumor befallen sind. Wie bereits diskutiert liegen wenige Studien vor, die die Intensität von PD-L1 beleuchten. Allerdings zeigen diese gegenläufigen Ergebnisse von Expressionshäufigkeit gegenüber Expressionsintensität innerhalb der hier vorliegenden Studie, dass die genaue Betrachtung lohnt.

5.5 PD-L1 als Angriffspunkt der Tumorthherapie

Mit der antikörperbasierten Tumorthherapie hat sich in den letzten Jahren eine neue Form der Krebsbehandlung etabliert. Durch die targeted therapy konnten in unterschiedlichen Entitäten großartige Erfolge gefeiert werden. Die Möglichkeiten an Angriffspunkten in der Tumorentstehung scheinen unzählig.

Für die PD-1/PD-L1-Achse sind weltweit aktuell fünf Medikamente auf dem Markt. Mit Nivolumab und Pembrolizumab sind zwei Wirkstoffe gegen PD-1 in Europa und den USA für die Therapie des fortgeschrittenen HNSCC zugelassen (174) (s.2.3.3). Die CheckMate 141 Studie von Ferris et al. führte dazu, dass Nivolumab eine Zulassung bei HNSCC mit Progression nach oder während einer Chemotherapie auf Platinbasis erhielt. In Folge der KEYNOTE-012 (149), KEYNOTE-040 (180) und KEYNOTE-048 (137) Studien sind die Antikörper in Therapieschemata aufgenommen worden. Pembrolizumab wird sowohl monotherapeutisch als auch mit ergänzenden platinhaltigen Chemotherapeutika bei PD-L1-positiven (CPS ≥ 1) lokal rezidivierenden, nicht resektablen oder metastasierten HNSCC eingesetzt. Sie werden von der Society for Immunotherapy of Cancer für bisher unbehandelte rezidierte oder metastasierte HNSCC mit einem CPS ≥ 1 für PD-L1 empfohlen (174). Burtness et al. konnten in der KEYNOTE-048 Studie zeigen, dass eine größere Effektivität der Anti-PD-L1-Therapie durch Pembrolizumab erzielt wird, wenn die PD-L1-Expression höher ist (137). Die gegen PD-L1 gerichteten Antikörper Atezolizumab, Avelumab und Durvalumab spielen bisher keine feste Rolle in der Therapie von OSCC oder OPSCC. De Sousa Linhares et al. postulieren in ihrer Studie, dass die Blockade von PD-L1 effektiver ist als die Blockade von PD-1 (45). Dem widersprechen die Ergebnisse von Ferris et al. Sie konnten in der EAGLE Studie kein signifikant besseres OS durch die Behandlung mit dem PD-L1 Antikörper Durvalumab gegenüber bereits etablierten Chemotherapeutika wie Platin, Paclitaxel, Methotrexat oder Cetuximab zeigen (192). In der aktuellen JAVELIN Phase III Studie von Yu et al. wird die Wirksamkeit von Avelumab bei lokal fortgeschrittenen HNSCC untersucht mit noch ausstehenden Ergebnissen (193).

Manche Studien beobachten bei der gegen PD-1 gerichteten Therapie eine höhere Rate an Nebenwirkungen, besonders in Form von Pneumonitiden, als bei der auf PD-L1 zielenden Tumorthherapie (194). Weitere Studien sind notwendig, um dies zu belegen. Einige Tumorentitäten, wie das fortgeschrittene NSCLC, werden bereits erfolgreich mit Anti-PD-1/Anti-PD-L1-Therapeutika behandelt (195). Es zeigte sich in Studien ein besseres Ansprechen bei hoher Ausprägung von PD-L1 (196). Hohe Ausprägung wurde in diesen Studien für einen TPS $>50\%$ definiert (196, 197). Bei Taube et. al korreliert das Ansprechen der gezielten Antikörpertherapie ebenfalls mit der PD-L1-Expression (190). In der Übersichtsarbeit von Kok et al. wurde untersucht, welche Ursachen es für ein Therapieversagen beim PD-1/PD-L1-Checkpoint als Angriffspunkt gibt. Dort werden diverse weitere Wege des Immunescape von HNSCC beschrieben. Somit fiel die Bewertung des CPS $>1\%$ -Grenzwertes als unzureichend aus, da lediglich der PD-1/PD-L1-Weg beachtet wird (198). Nach Aufnahme der gezielten Immuntherapie in die standardisierten Behandlungsschemata werden langfristige Datenerhebungen zeigen,

wie groß der Fortschritt durch diesen neuen Behandlungsweg für die Tumore des Kopf-Hals-Bereiches war.

5.6 OPSCC und OSCC im Vergleich

Anhand der statistischen Auswertung wurden mehrere Unterschiede zwischen OSCC und OPSCC deutlich. Es fiel auf, dass das Alter der Patienten mit einem OSCC im Schnitt 5,6 Jahre über dem der OPSCC Patienten lag. Diese Beobachtung fand sich auch in der Studie von Goldenberg et al. (199). Dort waren die Patienten mit oralen Tumoren im Schnitt 3,1 Jahre älter als bei oropharyngealen Tumoren. Jedoch war dort insgesamt das Kollektiv mit einem Altersschnitt von 75,8 Jahre deutlich älter. In anderen Studien wiederum konnte diese Beobachtung, dass Patienten mit oralen Tumoren älter sind, nicht bestätigt werden. Ein Erklärungsansatz für das niedrigere Erkrankungsalter der oropharyngealen PECA ist der Zusammenhang mit einer Infektion mit HPV. OPSCC ist häufiger assoziiert mit einer HPV- Infektion bei einem durchschnittlich jüngeren Patientenkollektiv (s. 2.1.2). In dem vorliegenden Patientenkollektiv zeigte sich ebenfalls diese Beobachtung. 28,9% der OPSCC waren HPV-positiv, lediglich 16,7% der OSCC. Mit 28,9% HPV-positiven Fällen von OPSCC sind die Zahlen der vorliegenden Studie kongruent zu den Ergebnissen anderer Studien (71).

Ein weiterer Unterschied liegt im Risikoverhalten. Patienten mit einem OPSCC zeigten signifikant häufiger einen Zusammenhang mit positiven Risikofaktoren ($p=0,002$). Besonders Raucher waren stärker vertreten. Die Zahl der Patienten mit positiver Nikotinanamnese lag um ca. 23 Prozentpunkte (83,1% vs. 60,3%) höher bei OPSCC Patienten. Zahlen, die sich vergleichbar auch in anderen Studien finden lassen. Sandaluche et al. hatten im OPSCC Kollektiv 89% der Patienten mit dem Risikofaktor Rauchen (200). Im OSCC Kollektiv von de Vicente et al. waren 67,2% der Patienten Raucher (188). Diese Beobachtung wurde in der Übersichtsarbeit von Hashibe et al. bestätigt (66).

In der vorliegenden Studie war innerhalb des OSCC Kollektivs die Zunge die häufigste Tumorlokalisation, gefolgt vom Mundboden. Diese Tendenz deckt sich mit den Daten aus der Vergleichsarbeit zu OSCC und OPSCC von Barros-Silva et al. Auch in deren 351 Personen starken OSCC Kollektiv war die Zunge die prädominante Lokalisation. Die, in dieser Arbeit unter distaler Oropharynx eingefasste, Epiglottis rangierte in den Kollektiven von Barros-Silva et al. und der vorliegenden Arbeit übereinstimmend an letzter Stelle (201).

In der Übersichtsarbeit von Ellington et al. zu oralen und oropharyngealen Tumoren war die Tonsilla palatina die prädominante Lokalisation, gefolgt von Zungengrund und Zunge (58). In der hier vorgestellten Studie war ebenfalls die Tonsilla palatina die häufigste Lokalisation innerhalb der OPSCC.

Patienten mit einem Tonsillenkarzinom hatten in der durchgeführten Studie das höchste OS der oropharyngealen Tumorpatienten, gefolgt von Tumoren des weichen Gaumens und der Uvula. Im Gegensatz dazu zeigte die Studie von Lifsics et al. ein deutlich vermehrtes Überleben der Patienten bei Zungengrundtumoren und Tumoren des weichen Gaumens (202). Dem widersprechend zeigte die Studie von Dogan et al. das schlechteste OS für Patienten mit einem Tumor des weichen Gaumens. Patienten mit einem Tonsillenkarzinom hatten in deren Studie ein besseres OS als Patienten mit Zungengrundtumoren (203). Generell lässt sich, wie bereits beschrieben, sagen, dass HPV-assoziierte Tumore ein besseres OS haben. Diese sind meist in den Tonsillen und am Zungengrund zu finden (s. 2.1.1), sodass sie dem weichen Gaumen überlegene Ergebnisse des OS zeigen (204).

In der multivariaten Analyse zu den Einflussfaktoren auf das Überleben (s. 4.8) zeigte sich interessanterweise ein Unterschied zwischen OSCC und OPSCC. Im Kollektiv der oralen PECA zeigte sich ein erwartbares Ergebnis. Ein höheres Alter und ein höherer T-Status (T3/T4) hatten einen signifikanten, lebensverkürzenden Einfluss (Alter, $p=0,002$; T-Status, $p=0,043$). In der Übersichtsarbeit von Zanoni et al. zeigten sich ebenfalls Alter und T-Status als unabhängige Faktoren für ein vermindertes OS (205). Diese Beobachtung ist logisch und nachvollziehbar und ist daher auch in der Leitlinie zum Mundhöhlenkarzinom so formuliert (13). Überraschend ist daher, dass sich dieser Einfluss im OPSCC-Kollektiv dieser Arbeit nicht nachvollziehbar war.

Alter und fortgeschrittener T-Status nahmen jeweils nur einen geringen Einfluss und waren in der statistischen Analyse nicht als signifikante unabhängige Faktoren für ein verringertes OS nachweisbar (Alter, $p=0,344$; T-Status, $p=0,810$). Ein möglicher Grund, dass das Alter bei den oropharyngealen Tumoren des Kollektivs einen geringeren Einfluss auf das OS ausübte, war das im Schnitt geringere Alter der Patienten. Mit durchschnittlich 61,7 Jahren waren sie 5,6 Jahre jünger als das OSCC-Kollektiv. Da mit wachsendem Alter die Komorbiditäten zunehmen und das Sterberisiko steigt, stellte das Alter einen Faktor mit wachsendem Einfluss, besonders auch bei Patienten mit einem HNSCC, dar. Bøje et al. sahen in ihrer Studie den Einfluss von Komorbiditäten bei Patienten mit HNSCC am stärksten rund um das 70. Lebensjahr (206). Dies macht deutlich, dass die OPSCC-Patienten im Rahmen der hier vorliegenden Studie

durchschnittlich noch nicht so stark durch ihr Lebensalter beeinflusst waren, wie die Patienten mit einem OSCC.

Ein Erklärungsansatz, dass der T-Status im OPSCC-Kollektiv einen geringeren Einfluss nahm, kann die geringere Anzahl an T4 Karzinomen sein. Mit 30,1% der Fälle im Stadium T3/T4 bei den oropharyngealen und 35,9% der oralen PECA lag der Wert für die Gesamtkollektive recht ähnlich. Während jedoch 21,8% der OSCC im T4-Stadium diagnostiziert wurden, waren nur 7,2% der OPSCC im weitest fortgeschrittenen Stadium. Dies ist eine deutliche Differenz. Die Literatur belegt, dass besonders mit fortgeschrittenem T-Status der negative Einfluss auf das OS wächst und somit ein deutlich höherer Anteil an T3 Tumoren im Vergleich der Gruppen T1/T2 gegenüber T3/T4 den statistischen Einfluss des T-Status mindern kann (207). Ein weiterer Faktor, der das OS im Vergleich der Kollektive von OSCC und OPSCC verändert und wie im Fall des T-Status zu überraschenden Ergebnissen geführt hat, kann der Resektionsrand sein. Mit 38,9% R1 resezierten OPSCC gegenüber 20,5% der OSCC gab es ein deutliches Gefälle zwischen den Entitäten. Dass der R-Status einen statistisch relevanten Einfluss auf das OS nimmt, konnte im Rahmen dieser Studie belegt werden ($p=0,024$). Diese Unterschiede werden ebenfalls Einfluss genommen haben auf die Unterschiede der Kollektive und womöglich die Bedeutung anderer Faktoren vermindert haben.

Im Bezug auf die PD-L1-Expression konnte ein Unterschied zwischen OSCC und OPSCC beobachtet werden. Der TPS lag für das OSCC rund 17 Prozentpunkte höher als für das OPSCC (47,8% vs. 39,6%; $p=0,159$). Für den Histoscore konnte die gleiche Beobachtung getätigt werden. Die OSCC hatten einen statistisch relevant höheren Wert als die OPSCC (65,4 vs. 41,2, $p=0,003$).

Zum aktuellen Zeitpunkt existiert keine andere Studie, die konkret die Ausprägung von PD-L1 bei OSCC und OPSCC vergleicht. Es gibt jedoch mehrere Studien, die in ihrem Kollektiv sowohl orale und oropharyngeale PECA im Zusammenhang mit PD-L1 untersucht haben. Bei Balermipas et al. sowie Schneider et al. zeigten die Tumore im Oropharynx bei einem cut-off von $\geq 5\%$ eine höhere Ausprägung von PD-L1 (155, 172). Bei Kim et al. wurden die Lokalisationen anders eingeteilt als in der vorliegenden Studie. Sie unterschieden Oropharynx, Zungengrund, weicher Gaumen und Zunge. Stellt man die Zunge den Lokalisationen Gaumen, Zungengrund und Oropharynx gegenüber, werden die Ergebnisse mit dieser Studie vergleichbar. Bei einem cut-off von $\geq 20\%$ zeigten in der Studie von Kim et al. die OSCC mit 72,1% PD-L1-positiven Fällen ein deutliches Übergewicht gegenüber den OPSCC mit 51,7% PD-L1-positiven Fällen

(150). Bei Müller et al. wurden ebenfalls OSCC und OPSCC verglichen. Sie bewerteten die PD-L1-Expression semiquantitativ in negativ, schwach und hoch. Als positiv wurden alle Fälle mit Färbung gewertet. Insgesamt zeigte sich ein gemischtes Bild der PD-L1-Expression. Es waren mehr OSCC als OPSCC negativ für PD-L1. Allerdings wurde ein um 9 Prozentpunkte höherer Wert für die starke Ausprägung von PD-L1 bei OSCC registriert (154). Es gibt diverse Studien zur PD-L1-Expression bei HNSCC, die einen cut-off von 5% oder 10% TPS verwendet haben (158, 160, 173, 183, 185, 187, 208-217). Vergleicht man all diese Studien in Hinblick auf die PD-L1-Expression bei OSCC und OPSCC ergibt sich ein durchschnittlicher TPS von 62% für OSCC und 56,6% für die OPSCC. Diese Auswertung spricht, übereinstimmend mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Studie, dass die oralen Tumore häufiger mit PD-L1 assoziiert sind als die oropharyngealen Tumore. Der Unterschied ist jedoch nicht sehr stark und die Varianz des TPS im Rahmen der einzelnen Studien ist sehr ausgeprägt. Offensichtliche Erklärungsansätze liegen nicht auf der Hand. Das Vorkommen von PD-L1 ist bereits auf diversen Geweben nachgewiesen worden ohne eine Präferenz erkenntlich zu machen durch die man auf typischen Expressionsmuster schließen könnte (218). Wie jedoch auch die Verteilung der HPV-positiven Tumore zeigt, gibt es zwischen der Schleimhaut von Mundhöhle und Oropharynx Unterschiede auf Zellebene. Zusammenfassend lässt sich urteilen, dass mehr Studien notwendig sind, um einen Unterschied der PD-L1-Expression bei den Entitäten OSCC und OPSCC sicher benennen zu können.

5.7 PD-L1 und HPV

Rund ein Viertel der Tumore des Kopf-Hals-Bereiches entstehen auf dem Boden einer HPV-Infektion (219). Bei Betrachtung der aktuellen Studienlage findet sich die Aussage, dass HPV-positive HNSCC mit einem verbesserten OS einhergehen (220). Ein Ergebnis, welches sich in der hier vorliegenden Studie bestätigte. Patienten mit einer HPV-Infektion hatten ein ca. 60% geringeres Sterberisiko als die HPV-negativen Patienten (s.4.8). Um diesem Einfluss auf das Outcome der Patienten gerecht zu werden, wurde 2017 eine neue TNM-Klassifikation für Kopf-Hals-Tumore veröffentlicht. Diese berücksichtigt die deutlichen Unterschiede im OS zwischen HPV-positiven Tumoren gegenüber denen ohne Nachweis einer Infektion mit HPV (106). Die in der vorliegenden Studie untersuchten Proben sind aufgrund des Entnahmedatums noch nach der 7. Auflage ausgewertet worden. Die 8. Auflage der TNM-Klassifikation hat, so van Gysen et al., eine bessere prognostische Genauigkeit. Im Speziellen werde für die UICC I und II Tumore eine exaktere Vorhersage ermöglicht (221). Trotz der besseren

Prognose von HPV-positiven HNSCC gibt es noch weitere Optimierungsmöglichkeiten. Durch konsequentes Impfen von Mädchen und Jungs könnten laut Näsman et al. die HPV-Infektionen um 80-90% reduziert werden. Es könnten durch diese Maßnahme weltweit über alle Entitäten verteilt, besonders die Zervixkarzinome eingeschlossen, rund 600.000 Tumorfälle jährlich vermieden werden (219).

In dem im Rahmen dieser Studie untersuchten Kollektiv waren 23% der eingeschlossenen Patienten p16-positiv. Damit lag der Anteil der HPV-positiven Fälle höher als beispielsweise im Kollektiv von Müller et al. mit lediglich 8,2% positiven Fällen (154). Eine zu dieser Studie vergleichbare Häufigkeit fand sich bei Schneider et al. mit 21% positiven Fällen (172). In der vorliegenden Studie zeigte sich keine Korrelation einer p16-Infektion zu Geschlecht oder Alter. Auch wurde kein Zusammenhang mit Wachstum oder Metastasierungsmuster der Tumore gesehen, was im Rahmen der Auswertung der TNM-Klassifikation deutlich geworden wäre. Auffällig war, dass die Tumore häufiger im Rachen als im Mundraum verteilt waren. Bei Badoual et al. befinden sich ebenfalls deutlich mehr HPV-positive Tumore im Oropharynx (n=49) gegenüber der Mundhöhle (n= 7) (222). Diese Tendenz bestätigt die Studie von Krüger et al., wo lediglich 6% der untersuchten OSCC HPV-positiv waren (63). Besonders häufig ist die Tonsilla palatina von HPV-positiven Tumoren betroffen. Im Rahmen der hier durchgeführten Studie waren 50% der Tonsillenkarzinome p16-positiv. In der De-ESCALaTE Studie von Jones et al. waren rund 65% der HPV-positiven HNSCC in der Tonsilla palatina lokalisiert (223). Bei Dogan et al. ließ sich ebenfalls eine Häufung von p16-positiven Tonsillenkarzinomen beobachten (203). Die Ursache für diese Häufigkeit in den Tonsillen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die Tonsillen anfälliger sind für einen Virusbefall (224, 225). Zu den ebenfalls häufig HPV-positiven PECA von Cervix und Anus wird ein Zusammenhang gesucht. Ähnlichkeiten, wie Übergangsepithel und Gemeinsamkeiten der extrazellulären Matrix werden diskutiert (225, 226). Weitere Studien müssen folgen, um die genaue Ursache belegen zu können.

Bezüglich eines konkreten Zusammenhangs zwischen einer HPV-Infektion und PD-L1-Expression ist die aktuelle Studienlage uneindeutig. Balermipas et al. und Lyford-Pike et al. sahen in ihren Arbeiten eine starke Korrelation zwischen HPV-Positivität und PD-L1-Expression bei HNSCC (155, 212). Anderen Studie hingegen berichteten von einer niedrigeren Anzahl PD-L1-positiver Tumorzellen bei HPV vermittelten Krebserkrankungen (149, 171). Im Rahmen dieser Studie konnten wir keinen Zusammenhang einer ausgeprägten PD-L1-Expression und einer HPV-Infektion nachweisen. Ebenfalls wurde keine verminderte Expression von PD-L1 bei HPV-

Positivität beobachtet. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien (172, 214, 215). Die Therapie von PD-L1 positiven HNSCC kann, nach aktueller Studienlage, unabhängig von dem HPV-Status getroffen werden (136).

6 Zusammenfassung

Diese Studie befasste sich mit den Unterschieden und Gemeinsamkeiten des Checkpoint-Proteins PD-L1 bei oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen. Für diese Tumorentitäten konnte in den letzten Jahrzehnten, trotz intensiver Bemühungen, kein zufriedenstellender Fortschritt für das Überleben der Patienten erzielt werden. Eine neue Hoffnung stellt die antikörperbasierte gezielte Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren dar. Ein für andere Tumore bereits erfolgreich genutztes Ziel ist die PD-1/PD-L1-Achse. In dieser Studie wurde die Häufigkeit und die Intensität des Liganden bei Tumorzellen des OSCC und OPSCC immunhistochemisch ausgewertet. Ein Augenmerk wurde auf den Einfluss und die Bedeutung von Grenzwerten zwischen Positivität und Negativität gelegt.

Es konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede der PD-L1-Expression zwischen OSCC und OPSCC gibt. Die Expression war bei oralen Tumoren um 8,2 Prozentpunkte stärker ausgeprägt. Die Auswertung des Histoscores zeigte die Unterschiede deutlicher (65,4 vs. 41,2; $p=0,003$).

Ein Einfluss von PD-L1 auf das OS oder DFS konnte nicht bewiesen werden. Des Weiteren konnte kein Zusammenhang von PD-L1-Expression und einer Infektion mit HPV belegt werden. Es wurde in dieser Arbeit übereinstimmend mit der Studienlandschaft deutlich, dass OPSCC deutlich häufiger im Zusammenhang mit einer HPV-Infektion stehen als OSCC. Die HPV-positiven Fälle von OPSCC hatten eine statistisch signifikant bessere Prognose als HPV-negative OPSCC.

Im Rahmen der Diskussion wurde dargestellt, dass die Rolle von PD-L1 bei PECA des Kopf-Hals-Bereiches bisher ambivalent in der Literatur diskutiert wird. Diese Problematik erschwert die Definition eines sinnvollen Grenzwertes, der einen Tumor als PD-L1-positiv definiert. Anhand der aktuellen Studienlage lässt sich keine sichere Aussage treffen, was es für das weitere Tumorwachstum und den Krankheitsverlauf bedeutet, wenn PD-L1 in überdurchschnittlichem Maß nachgewiesen wurde.

In dieser Richtung sind weitere Studien notwendig, um Handlungsweisen festlegen zu können.

7 Literaturverzeichnis

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Petersen PE. Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):454-60.
3. Wild CP, Stewart BW, editors. *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention.* Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2020.
4. Koch-Institut R, e.V. GdeKiD. *Krebs in Deutschland 2015/2016.* 2019.
5. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16.
6. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48(11):3282-7.
7. Ng M, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Dwyer-Lindgren L, Thomson B, et al. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *JAMA.* 2014;311(2):183-92.
8. Westra WH. The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. *Head Neck Pathol.* 2009;3(1):78-81.
9. Iyer NG, Tan DS, Tan VK, Wang W, Hwang J, Tan NC, et al. Randomized trial comparing surgery and adjuvant radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy in patients with advanced, nonmetastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 10-year update and subset analysis. *Cancer.* 2015;121(10):1599-607.
10. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):9-22.
11. Kalavrezos N, Bhandari R. Current trends and future perspectives in the surgical management of oral cancer. *Oral Oncol.* 2010;46(6):429-32.
12. Soo KC, Tan EH, Wee J, Lim D, Tai BC, Khoo ML, et al. Surgery and adjuvant radiotherapy vs concurrent chemoradiotherapy in stage III/IV nonmetastatic squamous cell head and neck cancer: a randomised comparison. *Br J Cancer.* 2005;93(3):279-86.
13. Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0. Leitlinienprogramm Onkologie. 2021(AWMF Registernummer: 007/100OL).
14. Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer--surgery. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):394-401.
15. Wu H, Huang S, Zhang D. Autophagic responses to hypoxia and anticancer therapy in head and neck cancer. *Pathol Res Pract.* 2015;211(2):101-8.
16. 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.
17. Lind H, Gameiro SR, Jochems C, Donahue RN, Strauss J, Gulley JM, et al. Dual targeting of TGF- β and PD-L1 via a bifunctional anti-PD-L1/TGF- β RII agent: status of preclinical and clinical advances. *J Immunother Cancer.* 2020;8(1).

18. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002;8(8):793-800.
19. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123-35.
20. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *The Lancet Oncology.* 2012;13(8):790-801.
21. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87(2):159-70.
22. Fung C, Zhou P, Joyce S, Trent K, Yuan JM, Grandis JR, et al. Identification of epidermal growth factor receptor (EGFR) genetic variants that modify risk for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer letters.* 2015;357(2):549-56.
23. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 2009;384(2):260-5.
24. Ang KK, Sturgis EM. Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Radiat Oncol.* 2012;22(2):128-42.
25. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus research.* 2002;89(2):213-28.
26. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell.* 1989;57(7):1083-93.
27. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993;75(3):495-505.
28. van Oijen MG, Slootweg PJ. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2138-45.
29. Hong A, Zhang X, Jones D, Veillard AS, Zhang M, Martin A, et al. Relationships between p53 mutation, HPV status and outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology.* 2016;118(2):342-9.
30. Mitra S, Banerjee S, Misra C, Singh RK, Roy A, Sengupta A, et al. Interplay between human papilloma virus infection and p53 gene alterations in head and neck squamous cell carcinoma of an Indian patient population. *Journal of clinical pathology.* 2007;60(9):1040-7.
31. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995;81(3):323-30.
32. Algarra I, García-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53(10):904-10.
33. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
34. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
35. Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Ge J, Xiang B, et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Molecular cancer.* 2019;18(1):10.

36. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*. 1992;11(11):3887-95.
37. 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. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(7):1027-34.
38. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999;5(12):1365-9.
39. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(9):3360-5.
40. Butte MJ, Pena-Cruz V, Kim MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol Immunol*. 2008;45(13):3567-72.
41. Chae YK, Arya A, Iams W, Cruz MR, Chandra S, Choi J, et al. Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):39.
42. Messal N, Serriari NE, Pastor S, Nunes JA, Olive D. PD-L2 is expressed on activated human T cells and regulates their function. *Mol Immunol*. 2011;48(15-16):2214-9.
43. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*. 2017;8(57):97671-82.
44. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2):207-12.
45. De Sousa Linares A, Battin C, Jutz S, Leitner J, Hafner C, Tobias J, et al. Therapeutic PD-L1 antibodies are more effective than PD-1 antibodies in blocking PD-1/PD-L1 signaling. *Sci Rep*. 2019;9(1):11472.
46. Flies DB, Sandler BJ, Sznol M, Chen L. Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy. *The Yale journal of biology and medicine*. 2011;84(4):409-21.
47. Habicht A, Dada S, Jurewicz M, Fife BT, Yagita H, Azuma M, et al. A link between PDL1 and T regulatory cells in fetomaternal tolerance. *J Immunol*. 2007;179(8):5211-9.
48. Morita M, Fujino M, Jiang G, Kitazawa Y, Xie L, Azuma M, et al. PD-1/B7-H1 interaction contribute to the spontaneous acceptance of mouse liver allograft. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010;10(1):40-6.
49. Tamura H, Dong H, Zhu G, Sica GL, Flies DB, Tamada K, et al. B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood*. 2001;97(6):1809-16.
50. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med*. 2003;9(5):562-7.
51. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia

- enhanced MDSC-mediated T cell activation. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211(5):781-90.
52. Kryczek I, Wei S, Gong W, Shu X, Szeliga W, Vatan L, et al. Cutting edge: IFN-gamma enables APC to promote memory Th17 and abate Th1 cell development. *J Immunol*. 2008;181(9):5842-6.
53. Lenouvel D, González-Moles M, Talbaoui A, Ramos-García P, González-Ruiz L, Ruiz-Ávila I, et al. An update of knowledge on PD-L1 in head and neck cancers: Physiologic, prognostic and therapeutic perspectives. *Oral Dis*. 2020;26(3):511-26.
54. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*. 2007;27(1):111-22.
55. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):269-82.
56. Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F, et al. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):51-64.
57. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
58. Ellington TD, Henley SJ, Senkomago V, O'Neil ME, Wilson RJ, Singh S, et al. Trends in Incidence of Cancers of the Oral Cavity and Pharynx - United States 2007-2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2020;69(15):433-8.
59. Rivera C. Essentials of oral cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(9):11884-94.
60. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*. 2010;46(6):414-7.
61. Morbini P, Alberizzi P, Ferrario G, Capello G, De Silvestri A, Pedrazzoli P, et al. The evolving landscape of human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma at a single institution in Northern Italy. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*. 2019;39(1):9-17.
62. Marklund L, Näsman A, Ramqvist T, Dalianis T, Munck-Wikland E, Hammarstedt L. Prevalence of human papillomavirus and survival in oropharyngeal cancer other than tonsil or base of tongue cancer. *Cancer Med*. 2012;1(1):82-8.
63. Kruger M, Pabst AM, Walter C, Sagheb K, Gunther C, Blatt S, et al. The prevalence of human papilloma virus (HPV) infections in oral squamous cell carcinomas: a retrospective analysis of 88 patients and literature overview. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014;42(7):1506-14.
64. Ramqvist T, Dalianis T. Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(11):1671-7.
65. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol*. 2006;42(5):461-74.
66. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(2):541-50.
67. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008;122(1):155-64.

68. Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, Zaridze D, Wunsch-Filho V, Winn DM, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol.* 2010;39(1):182-96.
69. Elrefaey S, Massaro MA, Chiocca S, Chiesa F, Ansarin M. HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale.* 2014;34(5):299-309.
70. Loning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Dermatol.* 1985;84(5):417-20.
71. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer.* 2017;141(4):664-70.
72. zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proceedings of the Association of American Physicians.* 1999;111(6):581-7.
73. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997;33(5):302-12.
74. Maden C, Beckmann AM, Thomas DB, McKnight B, Sherman KJ, Ashley RL, et al. Human papillomaviruses, herpes simplex viruses, and the risk of oral cancer in men. *American journal of epidemiology.* 1992;135(10):1093-102.
75. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer.* 2004;108(5):766-72.
76. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(19):1944-56.
77. Begum S, Westra WH. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPV status. *The American journal of surgical pathology.* 2008;32(7):1044-50.
78. Andersen AS, Koldjaer Solling AS, Ovesen T, Rusan M. The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2014;134(12):2755-63.
79. Gupta PC, Warnakulasuriya S. Global epidemiology of areca nut usage. *Addiction biology.* 2002;7(1):77-83.
80. Wen CP, Tsai MK, Chung WS, Hsu HL, Chang YC, Chan HT, et al. Cancer risks from betel quid chewing beyond oral cancer: a multiple-site carcinogen when acting with smoking. *Cancer causes & control : CCC.* 2010;21(9):1427-35.
81. Park S, Bae J, Nam BH, Yoo KY. Aetiology of cancer in Asia. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP.* 2008;9(3):371-80.
82. Kao SY, Lim E. An overview of detection and screening of oral cancer in Taiwan. *The Chinese journal of dental research : the official journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association (CSA).* 2015;18(1):7-12.
83. Chang LY, Wan HC, Lai YL, Kuo YF, Liu TY, Chen YT, et al. Areca nut extracts increased expression of inflammatory cytokines, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, interleukin-6 and interleukin-8, in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of periodontal research.* 2009;44(2):175-83.
84. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *Journal of oral pathology &*

- medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2008;37(1):1-10.
85. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2007;36(10):575-80.
 86. Thompson L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear, nose, & throat journal.* 2006;85(2):74.
 87. Scheifele C, Reichart PA. [Oral leukoplakia in manifest squamous epithelial carcinoma. A clinical prospective study of 101 patients]. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG.* 1998;2(6):326-30.
 88. Weber M, Wehrhan F, Baran C, Agaimy A, Büttner-Herold M, Öztürk H, et al. Malignant transformation of oral leukoplakia is associated with macrophage polarization. *Journal of translational medicine.* 2020;18(1):11.
 89. Hansen LS, Olson JA, Silverman S, Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology.* 1985;60(3):285-98.
 90. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology.* 1978;46(4):518-39.
 91. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia--a review. *Oral Oncol.* 2005;41(6):551-61.
 92. Aghbari SMH, Abushouk AI, Attia A, Elmaraezy A, Menshawy A, Ahmed MS, et al. Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A meta-analysis of 20095 patient data. *Oral Oncol.* 2017;68:92-102.
 93. Tilakaratne WM, Klinikowski MF, Saku T, Peters TJ, Warnakulasuriya S. Oral submucous fibrosis: review on aetiology and pathogenesis. *Oral Oncol.* 2006;42(6):561-8.
 94. Murti PR, Bhonsle RB, Pindborg JJ, Daftary DK, Gupta PC, Mehta FS. Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. *Community dentistry and oral epidemiology.* 1985;13(6):340-1.
 95. Markopoulos AK. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. *The open dentistry journal.* 2012;6:126-30.
 96. Bulsara VM, Worthington HV, Glenny AM, Clarkson JE, Conway DI, Macluskey M. Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: surgical treatment. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;12:CD006205.
 97. Ko HH, Cheng SL, Lee JJ, Chen HM, Wang CW, Cheng SJ, et al. Factors influencing the incidence and prognosis of second primary tumors in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2016;38(10):1459-66.
 98. Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thomas G, Muwonge R, Thara S, Mathew B, et al. Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomised controlled trial. *The Lancet.* 2005;365(9475):1927-33.
 99. Witcher TP, Williams MD, Howlett DC. "One-stop" clinics in the investigation and diagnosis of head and neck lumps. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007;45(1):19-22.
 100. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *The Lancet.* 2008;371(9625):1695-709.

101. Coca-Pelaz A, Takes RP, Hutcheson K, Saba NF, Haigentz M, Jr., Bradford CR, et al. Head and Neck Cancer: A Review of the Impact of Treatment Delay on Outcome. *Advances in therapy*. 2018;35(2):153-60.
102. Gage KL, Thomas K, Jeong D, Stallworth DG, Arrington JA. Multimodal Imaging of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 2017;24(2):172-9.
103. Stambuk HE, Karimi S, Lee N, Patel SG. Oral cavity and oropharynx tumors. *Radiologic clinics of North America*. 2007;45(1):1-20.
104. Park JO, Jung SL, Joo YH, Jung CK, Cho KJ, Kim MS. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging (MRI) in the assessment of tumor invasion depth in oral/oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2011;47(5):381-6.
105. Dang H, Chen Y, Zhang Z, Shi X, Chen X, Zhu X, et al. Application of integrated positron emission tomography/magnetic resonance imaging in evaluating the prognostic factors of head and neck squamous cell carcinoma with positron emission tomography, diffusion-weighted imaging, dynamic contrast enhancement and combined model. *Dento maxillo facial radiology*. 2020;49(5):20190488.
106. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(7):40.
107. Huang CC, Qiu JT, Kashima ML, Kurman RJ, Wu TC. Generation of type-specific probes for the detection of single-copy human papillomavirus by a novel in situ hybridization method. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1998;11(10):971-7.
108. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(1):24-35.
109. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):122-37.
110. Blatt S, Pabst A, Zimmer S, Walter C, Al-Nawas B, Krüger M. Clinical efficacy of an antibody-based detection system for human papilloma virus infection in oral squamous cell carcinoma. *Clinical oral investigations*. 2020.
111. Faraji F, Coquia SF, Wenderoth MB, Padilla ES, Blitz D, DeJong MR, et al. Evaluating oropharyngeal carcinoma with transcervical ultrasound, CT, and MRI. *Oral Oncol*. 2018;78:177-85.
112. O'Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, et al. The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *The Lancet Oncology*. 2017;18(7):849-51.
113. Wittekind C. The development of the TNM classification of gastric cancer. *Pathology international*. 2015;65(8):399-403.
114. Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, Wittekind C, Greene FL, Mason MD, et al. Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. *Int J Cancer*. 2014;135(2):371-8.
115. Kattan MW, Hess KR, Amin MB, Lu Y, Moons KG, Gershengwald JE, et al. American Joint Committee on Cancer acceptance criteria for inclusion of risk models for individualized prognosis in the practice of precision medicine. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(5):370-4.
116. Dahlstrom KR, Calzada G, Hanby JD, Garden AS, Glisson BS, Li G, et al. An evolution in demographics, treatment, and outcomes of oropharyngeal cancer

- at a major cancer center: a staging system in need of repair. *Cancer*. 2013;119(1):81-9.
117. Porceddu SV. A TNM classification for HPV+ oropharyngeal cancer. *The Lancet Oncology*. 2016;17(4):403-4.
118. O'Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, et al. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *The Lancet Oncology*. 2016;17(4):440-51.
119. Boeve K, Melchers LJ, Schuurin E, Roodenburg JL, Halmos GB, van Dijk BA, et al. Addition of tumour infiltration depth and extranodal extension improves the prognostic value of the pathological TNM classification for early-stage oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2019;75(3):329-37.
120. Bradish T, Fisher H, Paleri V, Robinson M, Meikle D, Kelly C, et al. How applicable is the TNM 8 staging for human papillomavirus (HPV) related oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) to a UK population of 106 patients? : A cohort comparison of the TNM 7 and TNM8 staging systems for HPV positive oropharyngeal cancer in a UK population. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. 2020.
121. deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF. Mundhöhlenkarzinom "Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. Leitlinienprogramm Onkologie. 2012(AWMF-Register-Nummer (007-100OL) Version 2.0).
122. Pan JJ, Ng WT, Zong JF, Chan LL, O'Sullivan B, Lin SJ, et al. Proposal for the 8th edition of the AJCC/UICC staging system for nasopharyngeal cancer in the era of intensity-modulated radiotherapy. *Cancer*. 2016;122(4):546-58.
123. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 1993;328(3):184-94.
124. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic proceedings*. 2016;91(3):386-96.
125. Burri RJ, Lee NY. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for head and neck cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 2009;9(3):293-302.
126. Singh SS, Bhatt MLB, Kushwaha VS, Singh A, Kumar R, Gupta R, et al. Role of matrix metalloproteinase 13 gene expression in the evaluation of radiation response in oral squamous cell carcinoma. *Journal of carcinogenesis*. 2017;16:2.
127. Pandya JA, Srikant N, Boaz K, Manaktala N, Kapila SN, Yinti SR. Post-radiation changes in oral tissues - An analysis of cancer irradiation cases. *South Asian journal of cancer*. 2014;3(3):159-62.
128. Stelzle F, Knipfer C, Schuster M, Bocklet T, Noth E, Adler W, et al. Factors influencing relative speech intelligibility in patients with oral squamous cell carcinoma: a prospective study using automatic, computer-based speech analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013;42(11):1377-84.
129. Singer S, Langendijk J, Yarom N. Assessing and improving quality of life in patients with head and neck cancer. *American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Annual Meeting*. 2013.
130. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93

- randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2009;92(1):4-14.
131. Gotwals P, Cameron S, Cipolletta D, Cremasco V, Crystal A, Hewes B, et al. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(5):286-301.
132. Burtneß B, Goldwasser MA, Flood W, Mattar B, Forastiere AA. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2005;23(34):8646-54.
133. Rivera F, García-Castaño A, Vega N, Vega-Villegas ME, Gutiérrez-Sanz L. Cetuximab in metastatic or recurrent head and neck cancer: the EXTREME trial. Expert review of anticancer therapy. 2009;9(10):1421-8.
134. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science (New York, NY)*. 2015;348(6230):56-61.
135. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.
136. Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral Oncol*. 2018;81:45-51.
137. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, Jr., et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet (London, England)*. 2019;394(10212):1915-28.
138. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.
139. Dolled-Filhart M, Locke D, Murphy T, Lynch F, Yearley JH, Frisman D, et al. Development of a Prototype Immunohistochemistry Assay to Measure Programmed Death Ligand-1 Expression in Tumor Tissue. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2016;140(11):1259-66.
140. Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, Roller A, Trefny M, Dimeloe S, et al. A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med*. 2018;24(7):994-1004.
141. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, Johrens K, Kirchner T, Reu S, et al. [Predictive PD-L1 immunohistochemistry for non-small cell lung cancer : Current state of the art and experiences of the first German harmonization study]. *Der Pathologe*. 2016;37(6):557-67.
142. Cheng WL, Wang CS, Huang YH, Liang Y, Lin PY, Hsueh C, et al. Overexpression of a secretory leukocyte protease inhibitor in human gastric cancer. *Int J Cancer*. 2008;123(8):1787-96.
143. Kirkegaard T, Edwards J, Tovey S, McGlynn LM, Krishna SN, Mukherjee R, et al. Observer variation in immunohistochemical analysis of protein expression, time for a change? *Histopathology*. 2006;48(7):787-94.
144. Kontis V, Bennett JE, Mathers CD, Li G, Foreman K, Ezzati M. Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble. *Lancet (London, England)*. 2017;389(10076):1323-35.

145. Pilleron S, Sarfati D, Janssen-Heijnen M, Vignat J, Ferlay J, Bray F, et al. Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study. *Int J Cancer*. 2019;144(1):49-58.
146. Sanmamed MF, Chen L. A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization. *Cell*. 2018;175(2):313-26.
147. Bauman JE, Ferris RL. Integrating novel therapeutic monoclonal antibodies into the management of head and neck cancer. *Cancer*. 2014;120(5):624-32.
148. Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1856-67.
149. 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.
150. 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.
151. (Destatis) SB. Mikrozensus - Fragen zur Gesundheit - Rauchgewohnheiten der Bevölkerung 2017. 2018.
152. Koch-Institut ZfKiR. Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten. DOI: 1018444/50301000500140001. 2020.
153. 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.
154. 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.
155. Balermipas P, Rodel F, Krause M, Linge A, Lohaus F, Baumann M, et al. The PD-1/PD-L1 axis and human papilloma virus in patients with head and neck cancer after adjuvant chemoradiotherapy: A multicentre study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Int J Cancer*. 2017;141(3):594-603.
156. <S3_Larynxkarzinom_2019-02.pdf>.
157. Janecka-Widła A, Mucha-Małecka A, Majchrzyk K, Halaszka K, Przewoźnik M, Słonina D, et al. Active HPV infection and its influence on survival in head and neck squamous-cell cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2020;146(7):1677-92.
158. Oliveira-Costa JP, de Carvalho AF, da Silveira da GG, Amaya P, Wu Y, Park KJ, et al. Gene expression patterns through oral squamous cell carcinoma development: PD-L1 expression in primary tumor and circulating tumor cells. *Oncotarget*. 2015;6(25):20902-20.
159. Koo BS, Lim YC, Lee JS, Choi EC. Management of contralateral N0 neck in oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2006;28(10):896-901.
160. Leduc C, Adam J, Louvet E, Sourisseau T, Dorvault N, Bernard M, et al. TPF induction chemotherapy increases PD-L1 expression in tumour cells and immune cells in head and neck squamous cell carcinoma. *ESMO open*. 2018;3(1):e000257.

161. Hanna GJ, Lizotte P, Cavanaugh M, Kuo FC, Shivdasani P, Frieden A, et al. Frameshift events predict anti-PD-1/L1 response in head and neck cancer. *JCI Insight*. 2018;3(4).
162. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2017;12(2):208-22.
163. Ilie M, Falk AT, Butori C, Chamorey E, Bonnetaud C, Long E, et al. PD-L1 expression in basaloid squamous cell lung carcinoma: Relationship to PD-1(+) and CD8(+) tumor-infiltrating T cells and outcome. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2016;29(12):1552-64.
164. 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.
165. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2018-28.
166. Chen Y, Huang Y, Lu X, Wang G, Chi P. Antitumor effects of the silencing of programmed cell death ligand 1 in colorectal cancer via immunoregulation. *Oncology reports*. 2018;40(6):3370-80.
167. Lee SL, Cabanero M, Hycrca M, Butler M, Liu FF, Hansen A, et al. Computer-assisted image analysis of the tumor microenvironment on an oral tongue squamous cell carcinoma tissue microarray. *Clin Transl Radiat Oncol*. 2019;17:32-9.
168. Watanabe A, Cornelison R, Hostetter G. Tissue microarrays: applications in genomic research. *Expert review of molecular diagnostics*. 2005;5(2):171-81.
169. Zito Marino F, Ronchi A, Stilo M, Cozzolino I, La Mantia E, Colacurci N, et al. Multiplex HPV RNA in situ hybridization/p16 immunohistochemistry: a novel approach to detect papillomavirus in HPV-related cancers. A novel multiplex ISH/IHC assay to detect HPV. *Infectious agents and cancer*. 2020;15:46.
170. Takakura H, Domae S, Ono T, Sasaki A. The Immunological Impact of Chemotherapy on the Tumor Microenvironment of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Acta medica Okayama*. 2017;71(3):219-26.
171. Satgunaseelan L, Gupta R, Madore J, Chia N, Lum T, Palme CE, et al. Programmed cell death-ligand 1 expression in oral squamous cell carcinoma is associated with an inflammatory phenotype. *Pathology*. 2016;48(6):574-80.
172. Schneider S, Kadletz L, Wiebringhaus R, Kenner L, Selzer E, Fureder T, et al. PD-1 and PD-L1 expression in HNSCC primary cancer and related lymph node metastasis - impact on clinical outcome. *Histopathology*. 2018;73(4):573-84.
173. Hirai M, Kitahara H, Kobayashi Y, Kato K, Bou-Gharios G, Nakamura H, et al. Regulation of PD-L1 expression in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment. *Int J Oncol*. 2017;50(1):41-8.
174. Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, Burtness B, Gillison ML, Harrington KJ, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on

- immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):184.
175. Solomon B, Young RJ, Bressel M, Urban D, Hendry S, Thai A, et al. Prognostic Significance of PD-L1(+) and CD8(+) Immune Cells in HPV(+) Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2018.
176. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3(1):32-5.
177. Obuchowski NA, Bullen JA. Receiver operating characteristic (ROC) curves: review of methods with applications in diagnostic medicine. *Physics in medicine and biology*. 2018;63(7):07tr1.
178. Schildhaus HU. [Predictive value of PD-L1 diagnostics]. *Der Pathologe*. 2018;39(6):498-519.
179. Lilja-Fischer JK, Eriksen JG, Georgsen JB, Vo TT, Larsen SR, Cheng J, et al. Prognostic impact of PD-L1 in oropharyngeal cancer after primary curative radiotherapy and relation to HPV and tobacco smoking. *Acta Oncol*. 2020;59(6):666-72.
180. Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn MJ, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet (London, England)*. 2019;393(10167):156-67.
181. Smith J, Robida MD, Acosta K, Vennapusa B, Mistry A, Martin G, et al. Quantitative and qualitative characterization of Two PD-L1 clones: SP263 and E1L3N. *Diagn Pathol*. 2016;11(1):44.
182. Chovanec M, Cierna Z, Miskovska V, Machalekova K, Svetlovska D, Kalavska K, et al. Prognostic role of programmed-death ligand 1 (PD-L1) expressing tumor infiltrating lymphocytes in testicular germ cell tumors. *Oncotarget*. 2017;8(13):21794-805.
183. De Meulenaere A, Vermassen T, Creytens D, Aspeslagh S, Deron P, Duprez F, et al. Importance of choice of materials and methods in PD-L1 and TIL assessment in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2018;73(3):500-9.
184. Yearley JH, Gibson C, Yu N, Moon C, Murphy E, Juco J, et al. PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(12):3158-67.
185. Ahn H, Yang JM, Kim H, Chung JH, Ahn SH, Jeong WJ, et al. Clinicopathologic implications of the miR-197/PD-L1 axis in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(39):66178-94.
186. Kogashiwa Y, Yasuda M, Sakurai H, Nakahira M, Sano Y, Gonda K, et al. PD-L1 Expression Confers Better Prognosis in Locally Advanced Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2017;37(3):1417-24.
187. Maruse Y, Kawano S, Jinno T, Matsubara R, Goto Y, Kaneko N, et al. Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018;47(7):836-45.
188. de Vicente JC, Rodríguez-Santamarta T, Rodrigo JP, Blanco-Lorenzo V, Allonca E, García-Pedrero JM. PD-L1 Expression in Tumor Cells Is an Independent Unfavorable Prognostic Factor in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(3):546-54.
189. Karpathiou G, Casteillo F, Giroult JB, Forest F, Fournel P, Monaya A, et al. Prognostic impact of immune microenvironment in laryngeal and pharyngeal

- squamous cell carcinoma: Immune cell subtypes, immuno-suppressive pathways and clinicopathologic characteristics. *Oncotarget*. 2017;8(12):19310-22.
190. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20(19):5064-74.
191. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Science translational medicine*. 2012;4(127):127ra37.
192. Ferris RL, Haddad R, Even C, Tahara M, Dvorkin M, Ciuleanu TE, et al. Durvalumab with or without tremelimumab in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: EAGLE, a randomized, open-label phase III study. *Ann Oncol*. 2020;31(7):942-50.
193. Yu Y, Lee NY. JAVELIN Head and Neck 100: a Phase III trial of avelumab and chemoradiation for locally advanced head and neck cancer. *Future oncology (London, England)*. 2019;15(7):687-94.
194. Khunger M, Rakshit S, Pasupuleti V, Hernandez AV, Mazzone P, Stevenson J, et al. Incidence of Pneumonitis With Use of Programmed Death 1 and Programmed Death-Ligand 1 Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Trials. *Chest*. 2017;152(2):271-81.
195. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823-33.
196. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10027):1540-50.
197. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823-33.
198. Kok VC. Current Understanding of the Mechanisms Underlying Immune Evasion From PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Blockade in Head and Neck Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:268.
199. Goldenberg D, Mackley H, Koch W, Bann DV, Schaefer EW, Hollenbeak CS. Age and stage as determinants of treatment for oral cavity and oropharyngeal cancers in the elderly. *Oral Oncol*. 2014;50(10):976-82.
200. Sandulache VC, Hamblin J, Lai S, Pezzi T, Skinner HD, Khan NA, et al. Oropharyngeal squamous cell carcinoma in the veteran population: Association with traditional carcinogen exposure and poor clinical outcomes. *Head Neck*. 2015;37(9):1246-53.
201. Barros-Silva PG, Fontes-Borges MM, Costa-Dias C, Mota-Lemos JV, Socorro-Saldanha-Cunha MD, Fernandes-Souza E, et al. Clinical-pathological and sociodemographic factors associated with the distant metastasis and overall survival of oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2020;25(3):e375-e82.
202. Lifšics A, Rate E, Ivanova A, Tars J, Murovska M, Groma V. Survival analysis of oropharyngeal squamous cell carcinoma patients linked to histopathology, disease stage, tumor stage, risk factors, and received therapy. *Experimental oncology*. 2020;42(1):51-9.

203. Dogan S, Xu B, Middha S, Vanderbilt CM, Bowman AS, Migliacci J, et al. Identification of prognostic molecular biomarkers in 157 HPV-positive and HPV-negative squamous cell carcinomas of the oropharynx. *Int J Cancer*. 2019;145(11):3152-62.
204. Marklund L, Holzhauser S, de Flon C, Zupancic M, Landin D, Kolev A, et al. Survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinomas (OPSCC) in relation to TNM 8 - Risk of incorrect downstaging of HPV-mediated non-tonsillar, non-base of tongue carcinomas. *Eur J Cancer*. 2020;139:192-200.
205. Zaroni DK, Montero PH, Migliacci JC, Shah JP, Wong RJ, Ganly I, et al. Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015). *Oral Oncol*. 2019;90:115-21.
206. Bøje CR, Dalton SO, Grønborg TK, Primdahl H, Kristensen CA, Andersen E, et al. The impact of comorbidity on outcome in 12 623 Danish head and neck cancer patients: a population based study from the DAHANCA database. *Acta Oncol*. 2013;52(2):285-93.
207. Keane FK, Chen YH, Neville BA, Tishler RB, Schoenfeld JD, Catalano PJ, et al. Changing prognostic significance of tumor stage and nodal stage in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx in the human papillomavirus era. *Cancer*. 2015;121(15):2594-602.
208. Chen RY, Lin YC, Shen WC, Hsieh TC, Yen KY, Chen SW, et al. Associations of Tumor PD-1 Ligands, Immunohistochemical Studies, and Textural Features in (18)F-FDG PET in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Sci Rep*. 2018;8(1):105.
209. Troeltzsch M, Woodlock T, Pianka A, Otto S, Troeltzsch M, Ehrenfeld M, et al. Is There Evidence for the Presence and Relevance of the PD-1/PD-L1 Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma? Hints From an Immunohistochemical Study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017;75(5):969-77.
210. Straub M, Drecoll E, Pfarr N, Weichert W, Langer R, Hapfelmeier A, et al. CD274/PD-L1 gene amplification and PD-L1 protein expression are common events in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncotarget*. 2016;7(11):12024-34.
211. Chen TC, Wu CT, Wang CP, Hsu WL, Yang TL, Lou PJ, et al. Associations among pretreatment tumor necrosis and the expression of HIF-1 α and PD-L1 in advanced oral squamous cell carcinoma and the prognostic impact thereof. *Oral Oncol*. 2015;51(11):1004-10.
212. 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 Res*. 2013;73(6):1733-41.
213. Ock CY, Kim S, Keam B, Kim S, Ahn YO, Chung EJ, et al. Changes in programmed death-ligand 1 expression during cisplatin treatment in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(58):97920-7.
214. Ock CY, Kim S, Keam B, Kim M, Kim TM, Kim JH, et al. PD-L1 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(13):15901-14.
215. Pai SI, Jack Lee J, Carey TE, Westra WH, Ferrone S, Moore C, et al. HLA class I antigen processing machinery (APM) component expression and PD-1:PD-L1 pathway activation in HIV-infected head and neck cancers. *Oral Oncol*. 2018;77:92-7.

216. Hanna GJ, Woo SB, Li YY, Barletta JA, Hammerman PS, Lorch JH. Tumor PD-L1 expression is associated with improved survival and lower recurrence risk in young women with oral cavity squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018;47(5):568-77.
217. Zhang P, Liu J, Li W, Li S, Han X. Lactoferricin B reverses cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cells through targeting PD-L1. *Cancer Med.* 2018.
218. Paver EC, Cooper WA, Colebatch AJ, Ferguson PM, Hill SK, Lum T, et al. Programmed death ligand-1 (PD-L1) as a predictive marker for immunotherapy in solid tumours: a guide to immunohistochemistry implementation and interpretation. *Pathology.* 2021;53(2):141-56.
219. Näsman A, Du J, Dalianis T. A global epidemic increase of an HPV-induced tonsil and tongue base cancer - potential benefit from a pan-gender use of HPV vaccine. *Journal of internal medicine.* 2020;287(2):134-52.
220. Wagner S, Reder H, Sharma SJ, Würdemann N, Wittekindt C, Klußmann JP. [HPV-associated oropharyngeal cancer-incidence, trends, diagnosis, and treatment]. *Der Urologe Ausg A.* 2018;57(12):1457-63.
221. van Gysen K, Stevens M, Guo L, Jayamanne D, Veivers D, Wignall A, et al. Validation of the 8(th) edition UICC/AJCC TNM staging system for HPV associated oropharyngeal cancer patients managed with contemporary chemo-radiotherapy. *BMC Cancer.* 2019;19(1):674.
222. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res.* 2013;73(1):128-38.
223. Jones DA, Mistry P, Dalby M, Fulton-Lieuw T, Kong AH, Dunn J, et al. Concurrent cisplatin or cetuximab with radiotherapy for HPV-positive oropharyngeal cancer: Medical resource use, costs, and quality-adjusted survival from the De-ESCALaTE HPV trial. *Eur J Cancer.* 2020;124:178-85.
224. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467-75.
225. Kuo KT, Hsiao CH, Lin CH, Kuo LT, Huang SH, Lin MC. The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinoma-molecular basis and predicting favorable outcome. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2008;21(4):376-86.
226. Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *Journal of virology.* 2006;80(18):8940-50.

8 Anhang

8.1 Erklärung

Ich, Constantin Rump, 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.

8.2 Danksagung

Aus Datenschutzgründen gelöscht.

8.3 Tabellarischer Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen gelöscht.