

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

**Retrospektive Analyse der Immunresponse von PD-L1-positiven  
Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches**

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

Vorgelegt von

Susanne Boltz  
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

*Widmung.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion .....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich.....</i>	3
2.1.1 Epidemiologie .....	3
2.1.2 Risikofaktoren .....	5
2.1.3 Pathogenese.....	9
2.1.4 Klinik und Diagnostik .....	11
2.1.5 Therapie.....	13
2.1.5.1 Immuntherapie.....	16
2.1.6 TNM-Klassifikation, Grading/Staging .....	23
2.2 <i>Das Immunsystem.....</i>	25
2.2.1 Zelluläre Immunantwort .....	26
2.2.2 Tumormikroumgebung.....	28
2.2.3 Immunantwort bei Tumorgeschehen .....	30
2.2.4 Bedeutung von inhibitorischen Checkpoints (PD-1, PD-L1, PD-L2).....	31
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.1 <i>Patientenkollektiv .....</i>	35
3.2 <i>TMA-Herstellung .....</i>	36
3.3 <i>Immunhistochemie .....</i>	38
3.4 <i>TNM-Klassifikation .....</i>	39
3.5 <i>Laborgeräte, Mikroskope.....</i>	40
3.6 <i>Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial .....</i>	40
3.7 <i>Analysesoftware und Datenbanken.....</i>	42
3.7.1 HALO und QuPath.....	42
3.7.2 TUBA .....	43
3.8 <i>Statistik.....</i>	43

3.8.1	Deskriptive Statistik .....	43
3.8.2	Schließende Statistik .....	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
4.1	<i>Analyse des Patientenkollektivs .....</i>	46
4.1.1	Geschlechts- und Altersverteilung .....	46
4.1.2	Tumorlokalisation.....	48
4.1.3	Tumorklassifikation .....	49
4.1.4	Therapie.....	51
4.1.5	Noxen .....	52
4.1.5.1	Tabak.....	52
4.1.5.2	Alkohol.....	53
4.1.6	Todesursache .....	53
4.1.7	PD-L1-Expression.....	53
4.1.8	Vergleich der Immunzellanzahl in Abhängigkeit der PD-L1-Expression..	55
4.1.8.1	CD3-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression .....	55
4.1.8.2	CD4-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression .....	56
4.1.8.3	CD8-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression .....	57
4.1.8.4	CD56-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression .....	58
4.1.8.5	CD68-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression .....	59
4.1.8.6	PD1-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression 60	
4.1.8.7	Regressionsanalyse .....	60
4.1.9	Überlebenszeitanalyse .....	61
4.1.9.1	Gesamtüberleben .....	61
4.1.9.2	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von dem UICC-Stadium .....	62
4.1.9.3	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression (3 Kategorien) .....	63

4.1.9.4	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression (2 Gruppen).....	65
4.1.9.5	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Immunzellinfiltration.....	66
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
5.1	<i>Diskussion der Methoden</i> .....	71
5.2	<i>Diskussion der Ergebnisse</i> .....	74
5.2.1	Patientenkollektiv .....	75
5.2.2	Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und der PD-L1-Expression .....	76
5.2.3	Immunzellinfiltrat in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression .....	77
5.2.4	Überlebenszeit in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression .....	78
5.2.5	Überlebenszeit in Abhängigkeit von dem Immunzellinfiltrat .....	81
5.2.5.1	T-Lymphozyten.....	82
5.2.5.2	Natürliche Killerzellen .....	85
5.2.5.3	Makrophagen.....	85
5.2.5.4	PD-1-exprimierende Immunzellen .....	86
5.2.6	Überlebenszeit in Abhängigkeit von der PD-L2-Expression .....	87
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>89</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>IV</b>
	<i>Versuchsprotokoll immunhistochemische PD-L1-Färbung</i> .....	<i>IV</i>
	<i>Bilder</i> .....	<i>VI</i>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>XIII</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XXVI</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XXVII</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>XXIX</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>XXX</b>

Abkürzungsverzeichnis

<	kleiner als
>	größer als
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APC-Gen	Adenomatöses Polyposis Coli-Gen
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AST	Aspartat-Aminotransferase
BOTSCC	base of tongue squamous cell carcinoma
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
cm	Zentimeter
CPS	combined positive score
CRT	Chemoradiation therapy
CT	Computertomographie
CTLA-4	Cytotoxic T-cell lymphocyte-associated protein 4
DFS	Disease-free survival
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG PS	Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluor-Desoxy-Glukose
FISH	Fluorescence in situ hybridization
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Gray
γ	Gamma
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung

HNC	head and neck cancer
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HNSCC	Head and Neck Squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillomavirus
ICD	International Classification of Diseases
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
IMAR	immune-mediated adverse reactions
IMBEI	Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik
JÜR	Jahresüberlebensrate
KI	Konfidenzintervall
KTSS	kombinierter Tumor-Stroma-Score
LK	Lymphknoten
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
mm	Millimeter
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NDPI	NanoZoomer Digital Pathology Image
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSCLC	non-small-cell lung cancer
OL	orale Leukoplakie
OS	Overall Survival
OSCC	oral squamous cell carcinoma
p16	Protein 16 (=Cyclin dependent kinase inhibitor 2A)
p53	Protein 53
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD(-1)	Programmed Cell Death (Protein) (-1)
-L1/2	-Ligand 1/2
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	potentia Hydrogenii
pRb	Retinoblastom-Protein

pTNM	pathologische TNM-Klassifikation
py	pack years
QALY	quality-adjusted life-year
R/M	rezidiert/metastasiert
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
S.	Seite
SCC	squamous cell carcinoma (= invasives Plattenepithelkarzinom)
SIL	Squamöse intraepitheliale Läsion (intraepitheliale Plattenepithelläsion)
T(I)ME	tumor (immune) microenvironment
Tab.	Tabelle
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TMA	Tissue Microarray
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TPS	tumor proportion score
TRS	Target Retrieval Solution
UICC	International Union Against Cancer
USA	United States of America
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Epidermal Growth Factor
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Ein Großteil der Patienten aller medizinischer Fachdisziplinen weist onkologische Erkrankungen auf, deren Diagnostik, Therapie und Prävention das Gesundheitssystem stets vor neue Herausforderungen stellt. Trotz ständiger Fortschritte in der Onkologie, neuer Erkenntnisse der Tumorpathogenese und der Früherkennung sowie multimodaler Therapiekonzepte, ist die Sterblichkeit an bestimmten Tumorerkrankungen, wie z.B. dem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC), immer noch äußerst hoch und bedarf weiterer intensiver Forschung (1).

Das Therapieansprechen und die Überlebenschancen haben sich insgesamt über die letzten Jahre etwas verbessert, jedoch bei steigender Morbidität und deutlich schlechteren Ergebnissen bei lokal fortgeschrittenen, rezidivierenden und metastasierten Tumoren. In vielen Fällen kommt es trotz kontinuierlicher Weiterentwicklung in Bereichen der Chirurgie, sowie der Strahlen- und Chemotherapie bei den betroffenen Patienten zu einer gewissen Toxizität, Funktionseinschränkungen und einer verminderten Lebensqualität (2).

Aufgrund mangelnder flächendeckender Screenings- und Früherkennungsmöglichkeiten (3) befinden sich ca. 60% der Patienten bei der Erstdiagnose eines HNSCC bereits im lokal fortgeschrittenen Stadium mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 50%. Bei den meisten Patienten mit HNSCC kommt es im Krankheitsverlauf schließlich entweder zu einem Lokalrezidiv oder zu einer Fernmetastasierung, die mediane Überlebenszeit sinkt dann trotz entsprechender Therapie auf 10 Monate (4, 5). Die stetig steigende allgemeine Lebenserwartung macht es außerdem notwendig auch für ältere Patienten mit multiplen Vorerkrankungen und hohem Operations- und Therapierisiko adäquate Therapieoptionen mit tolerablerem Nebenwirkungsprofil zu etablieren (6).

Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung und Progression von Malignomen ist ein wichtiges Forschungsgebiet der modernen Medizin. Tumore sind in der Lage der Erkennung durch das Immunsystem zu entkommen, was ihnen die Progression und Metastasierung ermöglicht. Dies geschieht zu einem großen Teil mittels verschiedener Oberflächenmoleküle, die Tumorzellen exprimieren, um einer Zerstörung entgegenzuwirken. Durch Stärkung der Immunantwort gegen entartete Zellen kann somit ein Fortschreiten der Erkrankung gehemmt werden. Neue technische Möglichkeiten und die kontinuierliche Weiterentwicklung von Standardprozeduren ermöglichen es,

molekulare Tumorstrukturen immer einfacher zu identifizieren und ggf. therapeutisch zu nutzen.

Durch ein besseres Verständnis für die Steuerung der Anti-Tumor-Immunität durch ein empfindliches Gleichgewicht zwischen immunstimulierenden und immunhemmenden Pfaden in der Mikroumgebung des Tumors ist anzunehmen, dass durch gezielte Blockierung hemmender Wege oder Stimulierung aktivierender Wege die Anti-Tumor-Aktivität gestärkt werden kann. Die Blockierung der hemmenden Bahnen erfolgt mit sogenannten Checkpoint-Inhibitoren, die schlussendlich zu einer Verstärkung der Immunantwort gegen Krebszellen führen (7). Die Immuntherapie scheint somit ein sinnvoller neuartiger Therapieansatz zur Behandlung von Tumoren zu sein; sie stellt das Immunsystem wieder her und ermöglicht die immunvermittelte Eliminierung von Tumorzellen (1).

Die genauere Kenntnis der Tumor-Mikroumgebung (TME) zusammen mit weiteren (z.B. genetischen) Merkmalen des Tumors erweitert das Wissen in der Krebsentstehung und -progression und führt schließlich zu wirkungsvollen Fortschritten in der Krebstherapie. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches gehen mit einer ausgeprägten Interaktion mit dem menschlichen Immunsystem einher und bieten somit Spielraum für neue immuntherapeutische Ansätze (2). Die Wirksamkeit dieser Therapiemöglichkeiten wurde bereits bei verschiedenen anderen Tumorentitäten nachgewiesen (1, 8, 9). Vor allem Checkpoint-Inhibitoren (z.B. durch Blockade des immun-supprimierenden PD1-/PD-L1-Signalweges) führen zu einem besseren Gesamtüberleben, einer Verbesserung der Lebensqualität und haben ein günstigeres Toxizitätsprofil, was bereits zu einer Integration dieser Medikamente in einige Standardtherapie-regimes geführt hat. Die generelle Ansprechbarkeit auf Immuntherapeutika bleibt jedoch gering, was es umso wichtiger macht mögliche Kombinationsmöglichkeiten der etablierten Therapien zu erforschen und prädiktive Biomarker zu identifizieren (10, 11). In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, inwieweit immunhistochemisch bestimmbare Marker der Tumormikroumgebung eine Bedeutung für die Diagnostik bzw. die Beurteilung der Prognose haben und ob daraus Therapiemöglichkeiten abgeleitet werden können. Die kombinierte Analyse der PD-L1-Expression und der Immunzellen in der Mikroumgebung des Tumors könnte dazu beitragen, eine bessere Vorhersage bezüglich eines möglichen (Immun)therapieerfolges machen zu können bzw. neue Therapiemöglichkeiten zu etablieren (12).

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich

Das Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses geht vom Plattenepithel des oberen Aerodigestivtraktes aus und ist die häufigste bösartige Erkrankung im Kopf-Hals-Bereich. Zu den anatomischen Sublokalisationen gehören die Nasen- und Mundhöhle inklusive der Zunge und dem Mundboden, der Rachen und der Kehlkopf (13).

Auch wenn zu den Kopf-Hals-Tumoren noch andere Tumorentitäten gerechnet werden, ist das Plattenepithelkarzinom mit über 90% der Fälle die mit Abstand häufigste (3, 14). Es gibt verschiedene histologische Subtypen von Plattenepithelkarzinomen: am häufigsten ist das alkohol- und tabakassoziierte konventionelle/keratinisierende SCC zu finden. Weiterhin existieren noch das lokal aggressive aber wenig invasive, gut differenzierte verruköse Karzinom mit guter Prognose, das sehr seltene, aber aggressive basaloide SCC und noch weitere seltenere Formen (spindelzelliges, papilläres SCC und adenosquamöses Karzinom) (15, 16).

Die häufigsten Metastasierungswege des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich sind die regionalen Halslymphknoten und Fernmetastasen (unterhalb des Schlüsselbeines) in mediastinalen, axillären und inguinalen Lymphknoten, sowie Lunge, Leber, Skelettsystem, Haut und Gehirn. Aufgrund der anatomischen Lagebeziehungen und der Vaskularisierung metastasieren Karzinome des Zungengrundes schneller als beispielsweise Glottistumore oder Zungenkörperkarzinome (17).

#### 2.1.1 Epidemiologie

Tumorerkrankungen waren im Jahr 2015 nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit. Krebserkrankungen stellen das Gesundheitssystem aufgrund der steigenden Inzidenz und Anzahl krebsbedingter Todesfälle vor eine immer größer werdende Herausforderung (6).

In Deutschland wurde im Jahr 2016 bei über 490.000 Menschen eine Krebsdiagnose gestellt, fast 230.000 Menschen erlagen ihrem Krebsleiden. Für das Jahr 2020 wurde mit einem Anstieg der Krebsinzidenz auf knapp 510.000 Krebsneuerkrankungen gerechnet (18).

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches sind die achthäufigste neu diagnostizierte Krebsform der Welt und liegen bei der Mortalität ebenfalls auf Platz 8 weltweit (19).

Zu den Kopf-Hals-Tumoren gehören Karzinome der Lippe, der Mundhöhle, des Rachens (Oro-/Naso-/Hypopharynx) und des Larynx. Diese Tumorentitäten wurden weltweit bei ca. 890.000 Patienten im Jahr 2017 neu diagnostiziert (Lippe und Mundhöhle: 390.000; Nasopharynx: 110.000; restlicher Pharynx: 179.000; Larynx: 211.000) und waren im selben Jahr für über 500.000 Todesfälle (Lippe und Mundhöhle: 194.000; Nasopharynx: 70.000; restlicher Pharynx: 117.000; Larynx: 126.000) ursächlich. Männer sind hierbei mehr als doppelt so häufig betroffen wie Frauen (20).

Tumore der Lippe und der Mundhöhle waren 2015 die 15. häufigste neu diagnostizierte Krebserkrankung weltweit, mit einer deutlich höheren Inzidenz in Süd- und Südostasien, Lateinamerika und Afrika (21).

Es ist im letzten Jahrzehnt eine Verschiebung in der Verteilung der Primärlokalisationen zu verzeichnen, die durch eine stetige Zunahme von oropharyngealen Karzinomen und einem Rückgang von Kehlkopf- und Hypopharynxkarzinomen gekennzeichnet ist. Gleichzeitig beobachtet man einen Rückgang des Zigarettenrauchens und eine Zunahme der HPV-Infektionen in der Bevölkerung (22) .

Die Inzidenz von Krebserkrankungen der Lippe, der Mundhöhle und des Rachens (ICD C00-C14) in Deutschland betrug für das Jahr 2013 laut RKI Krebsbericht 13.130 Neuerkrankungen. 5473 Menschen sind an diesem Krebsleiden im selben Jahr bundesweit verstorben. (23, S.21). Das mittlere Alter bei Diagnosestellung eines HNSCC ist von 59,9 Jahren im Jahr 1985 auf 64,2 Jahre im Jahr 2016 gestiegen (24) Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Frauen bei 66,2 Jahren, bei Männern bei 63,8 Jahren; in den letzten Jahren erkrankten immer mehr Frauen und jüngere Menschen. Die geographischen, sowie alters- und geschlechtsspezifischen Schwankungen sind vermutlich auf Lebensstilfaktoren (wie z.B. Risikofaktoren), Früherkennungsprogramme und medizinische Versorgungsstrukturen zurückzuführen (23, S. 57-58).

Das 5-Jahres-Überleben bei Mundhöhlen und Pharynx-Karzinomen liegt bei leitliniengerechter Therapie bei ca. 64% (25). Diese insgesamt geringen Überlebenschancen sind darauf zurückzuführen, dass die meisten HNSCC erst in einem fortgeschrittenen und/oder metastasierten klinischen Stadium diagnostiziert und therapiert werden, da sie in frühen Stadien meist lange symptomarm sind. 10-20% der Patienten, die in

einem frühen Krankheitsstadium diagnostiziert werden, erleiden im Verlauf ein Rezidiv, Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren bei Diagnose haben ein bis zu fünfzig prozentiges Risiko für ein lokoregionäres Rezidiv im Verlauf (26), welches meist innerhalb der ersten zwei Jahre nach Erstdiagnose auftritt (27).

Patienten mit rezidivierendem/metastasiertem Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses haben eine schlechte Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von weniger als einem Jahr (ca. 10 Monate) (26). Bei Patienten, die sich nicht für eine Chemotherapie eignen oder ein Rezidiv nach platinhaltiger Chemotherapie erleiden sinkt die Wahrscheinlichkeit ein Jahr zu überleben auf unter 5% (10).

Es konnte gezeigt werden, dass vor allem ab dem 80. Lebensjahr mit steigendem Lebensalter der Patienten bei Erstdiagnose eines HNSCC das krankheitsspezifische Überleben drastisch sinkt. Ein möglicher Grund sind modifizierte Therapieprotokolle und ein verändertes Therapie-Risikoprofil bei älteren Patienten. Meist bekommen ältere Patienten aufgrund multipler Vorerkrankungen und einer erhöhten Gebrechlichkeit keine aggressiven Erstlinien-Therapien mehr und haben somit geringere Chancen auf Heilung (24).

### 2.1.2 Risikofaktoren

Für das Mundhöhlenkarzinom gilt der Tabakkonsum als wichtigster Risikofaktor, dicht gefolgt vom Alkoholkonsum. Insgesamt ist das Risiko an einem Mundhöhlenkarzinom zu erkranken bei chronischem Tabak- oder Alkoholkonsum bis zu 6-fach erhöht, bei Kombination beider Risikofaktoren bis zu 30-fach erhöht (15).

Schon für epitheliale Vorläuferläsionen der Mundhöhle und des Oropharynx gilt der Tabakkonsum als wichtigster Risikofaktor, unabhängig davon, ob der Tabak geraucht, gekaut oder geschnupft wird. Das Risiko für eine maligne Transformation ist vor allem bei dem Konsum von zwanzig oder mehr Zigaretten pro Tag und dem Genuss von „starken Weinen“ oder Branntwein mit einem erhöhten Risiko assoziiert (17, S.8). Generell haben aber auch Raucher von wenigen Zigaretten pro Tag und über einen kurzen Zeitraum bereits ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Das Risiko von aktiven Rauchern steigt linear mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag. Der Zeitraum und die Dauer des Nikotinkonsums führen ebenso dosisabhängig zu einem deutlichen Anstieg des Risikos (3).

Trotzdem zeigen sich Unterschiede zwischen dem Rauchen von filterlosen Zigaretten, Kautabak, sowie Zigarren und Pfeifen im Vergleich zum Rauchen von Zigaretten mit Filter; es wurde gezeigt, dass das Rauchen von Zigaretten mit Filter ein bis zu 50% geringeres Risiko darstellt (28).

Bei Aufgabe des Nikotin-Konsums sind bereits nach 1-3 Jahren rückläufige Zahlen zu erwarten, jedoch ist erst nach 17 Jahren das Risiko vergleichbar mit Nie-Rauchern (3). Bis zu 90% aller HNSCC-Patienten weisen eine Raucheranamnese auf und Raucher haben insgesamt ein 4-5-fach erhöhtes Risiko an einem HNC zu erkranken (26).

Als ebenso wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer oralen Dysplasie wird der Alkoholgenuss angesehen (17, S.8). Der Konsum von hochprozentigem Alkohol und Bier ist mit einem höheren Risiko assoziiert als der Konsum von Wein; dies ist vermutlich auf verschiedene Inhaltsstoffe abgesehen von Ethanol (wie z.B. Nitrosamine und polyzyklische Kohlenwasserstoffe in Bier) zurückzuführen (28). Bereits der Konsum von einem alkoholischen Getränk täglich führt zu einer Risikoerhöhung, die mit steigender Menge und Dauer des Konsums zunimmt und nach zwanzig Jahren regelmäßigen Alkoholkonsums zu einer signifikanten Risikoerhöhung führt. Nach Aufgabe des Genusses von Alkohol beginnt die Normalisierung des Risikos nach drei Jahren und erreicht nach vierzehn Jahren dann das Niveau eines Nie-Trinkers (3).

Auch die Art des Tabaks bzw. des Alkohols scheint eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese zu spielen; beim Konsum von schwarzem Tabak und Spirituosen zeigte sich ein 2 bis 4-fach erhöhtes Risiko für Mundhöhlen-/Oropharynx-Karzinome, verglichen zu hellem Tabak und Bier- bzw. Weinkonsum. Diese Erkenntnisse könnten auf die höhere Konzentration von potenziell karzinogenen Substanzen (wie z.B. N-Nitrosaminen und Urethan) in schwarzem Tabak zurückzuführen sein. Bei alkoholischen Getränken gelten vor allem die entstehenden Metaboliten (beispielsweise Acetaldehyd) als Karzinogene (3). Ethanol selbst scheint keine direkt kanzerogene Wirkung zu haben, steigert jedoch die Umwandlung von Prokarzinogenen zu Mitogenen und führt über seine Abbauprodukte zu einer DNA-Strukturveränderung in menschlichen Zellen (29). Acetaldehyd entsteht bereits bei Kontakt von Ethanol mit menschlichem Speichel im Mundraum und kann dort direkt die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes schädigen. Außerdem wirkt Alkohol bei verschiedenen Mechanismen und Signalwegen als Co-Karzinogen; Alkohol erhöht die Permeabilität der Schleimhaut für andere

Karzinogene, induziert Tabakkarzinogen-verarbeitende Enzyme und schädigt direkt die Schleimhaut (3).

Bei alleinigem Konsum von Nikotin oder Alkohol zeigt sich nur ein moderat, aber kein signifikant erhöhtes Risiko, die Kombination beider führt durch den synergistischen Effekt, auch bei moderatem Konsum, zu einem bis zu 35-fach erhöhten Risiko für die Entwicklung einer dysplastischen Veränderung verglichen zu Nichtrauchern und Nichttrinkern (3, 28).

Es bleibt auch nicht auszuschließen, dass sich rauchende und trinkende Menschen ebenso in anderen Lebensbereichen, wie zum Beispiel Nahrungsgewohnheiten (wenig Obst/Gemüse), vom Rest der Bevölkerung unterscheiden (3).

Es zeigt sich zusammenfassend, dass sowohl der alleinige Nikotin- oder Alkoholkonsum als auch der meist kombinierte Konsum beider Faktoren den wichtigsten Risikofaktor für das Entstehen eines oralen bzw. pharyngealen Karzinoms darstellt. Weiterhin steigt das Risiko bei diesen Risikofaktoren dosisabhängig. Es ist davon auszugehen, dass drei Viertel dieser Karzinome durch Alkohol und/oder Nikotin verursacht sind. (28).

Ein weiterer, immer wichtiger werdender Risikofaktor, vor allem für einige Subgruppen des HNSCC (Zungengrund, Oropharynx, Rachenmandeln), ist das Humane Papillomavirus (23, S.57). HPV ist ein doppelsträngiges DNA-Virus, welches zu einer Infektion des Plattenepithels im menschlichen Körper führt und somit für die meisten sexuell übertragbaren viralen Infektionen ursächlich ist. Die über 100 bekannten HPV-Subtypen werden in low-risk oder high-risk eingeteilt. Low-risk Subtypen (wie z.B. 6 und 11) können zu benignen und transienten Läsionen führen, wohingegen high-risk Typen (z.B. 16, 18, 31, 33, 35, ...) eine maligne Transformation stimulieren können. Nach der Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom werden bestimmte Onkogene überexprimiert, was wiederum über die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (p53 und pRb) zum unkontrollierten Zellwachstum unter Umgehung der Kontrollmechanismen (Checkpoints) führt. Durch die somit entstehende Akkumulation von Mutationen kommt es zur malignen Zelltransformation (30, 31). Durch gestörte immunologische Prozesse bei der Erkennung und Eliminierung virusinfizierter Zellen kommt es zur Chronifizierung der HPV-Infektion (1).

Beim Nachweis von HPV in kanzerösen Läsionen der Mundhöhle muss zwischen der reinen Besiedlung und dem biologisch aktiven Virus, sowie zwischen den einzelnen

Subtypen unterschieden werden. Die Besiedlung allein ist sehr häufig und nicht zwangsläufig ein Risikofaktor für die Entstehung eines Karzinoms. Mittels kombinierter Methoden aus p16-Immunhistochemie und RNA-/DNA-Nachweisen können genauere Aussagen getroffen werden (15, S.22). Eine aktive Infektion wird durch die Überexpression von p16 und dem gleichzeitigen Vorliegen von HPV-DNA oder -RNA nachgewiesen (30).

Die genaue Prävalenz von aktiven HPV-Infektionen im Zusammenhang mit HNSCC ist in der Literatur heterogen beschrieben. Einer Metaanalyse des Jahres 2020 zufolge waren 35% der vorliegenden HNSCC HPV-positiv und 66% negativ – hierbei wurde jedoch nicht immer zwischen der reinen Besiedlung und der aktiven Infektion unterschieden (1). In einer neueren Studie aus Polen, die im Jahre 2020 veröffentlicht wurde, lag die kumulierte Prävalenz von aktiven HPV-Infektionen (HPV-DNA Nachweis) bei HNSCC bei ca. 20%. Etwas niedrigere Raten an HPV-Infektionen lieferte eine sehr große internationale Studie aus dem Jahr 2016, bei der nur etwa 12% der HNSCC HPV-DNA aufwiesen. Betrachtet man abgesehen von der HPV-DNA noch HPV-RNA und p16 sinkt die Rate HPV-positiver HNSCC auf 5,6%. Es gibt eine deutliche Heterogenität des HPV-Status bezogen auf die anatomische Lage: Oropharynxkarzinome sind deutlich häufiger von HPV betroffen als Mundhöhlenkarzinome bzw. Larynxkarzinome (30, 32). Es ist in den letzten Jahren ein Anstieg HPV-assoziiierter Tumoren zu verzeichnen, was nicht zuletzt auch an verbesserten Möglichkeiten der Testung (mittels PCR, p16-Bestimmung, FISH) liegen kann. Aktuell liegt die geschätzte Prävalenz HPV-assoziiierter Tumore der Mundhöhle bei unter 5%, höhere Schätzwerte sind zurückzuführen auf den alleinigen Nachweis von HPV-DNA, was keinen Hinweis auf eine aktive Infektion liefert (15, S.23). Am häufigsten (90% der Fälle) liegt eine Infektion mit dem HPV-16 Virus vor, bei der zwischen der Infektion und der malignen Transformation meist mindestens 10 Jahre liegen (26).

Bei HPV-Infektion zeigte sich ein signifikant verbessertes Überleben (OS und DFS) der betroffenen Patienten. Dies könnte zum Einen auf eine verbesserte Radio-/Chemosensitivität zum Anderen auch auf eine verbesserte Immunreaktion des Körpers zurückzuführen sein (30). Bezogen auf die Tumormikroumgebung gibt es Grund zur Annahme, dass die HPV-Infektion die Expression immunhemmender Rezeptoren/Liganden (PD-1/PD-L1) induzieren kann (13, 33-35).

Zusammenfassend betrachtet zeigen HPV-positive Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches spezifische Risikofaktoren, eine veränderte Tumorbilogie und Histopathologie und gehen, auch aufgrund eines besseren Ansprechens auf eine Immuntherapie, mit einer deutlich verbesserten Prognose einher (1, 8, 13).

Für Tumore des Nasenrachenraumes (Nasopharynx) ist auch die berufliche Exposition mit bestimmten Chemikalien und Holzstäuben als ursächlich anzusehen (23).

Einer Studie aus Kanada zufolge ist auch der sozio-ökonomische Status relevant für das Entstehen von Mundhöhlen-/Pharynx- und Larynxkarzinomen; hierbei konnte gezeigt werden, dass Menschen mit niedrigem sozioökonomischem Status (z.B. ungelernete Arbeiter) ein signifikant höheres relatives Risiko für die Entwicklung eines Tumors haben, als ausgebildete Arbeiter bzw. Fachpersonal. Ebenso wurde gezeigt, dass unverheiratete Menschen ein höheres Risiko haben als Verheiratete. Hierbei war das Risiko vor allem bei geschiedenen Männern besonders hoch (29).

Auch genetische Polymorphismen bei alkohol- und tabakabbauenden Enzymen und das Kauen von Betelnuss-Zubereitungen stehen im Zusammenhang mit einem erhöhten HNSCC-Risiko (27).

Frühere Studien zu Nahrungsgewohnheiten zeigten ein erhöhtes Risiko bei einseitiger Ernährung, beispielsweise übermäßigem Konsum von Fleisch oder gebratenem Essen (36, 37) und geringer Zufuhr von Obst und Gemüse, sowie einer familiären Disposition durch genetische Faktoren (3).

Ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem oralen Mikrobiom und der Entstehung von HNSCC konnte bisher nicht nachgewiesen werden, eine größere Besiedlung mit Corynebakterium und Kingella war in einer (kleinen) Studie jedoch signifikant mit einem verringerten HNSCC-Risiko (v.a. für Larynx-Karzinome und bei Rauchern) assoziiert, da diese Bakterien in der Lage sind, toxische Stoffe (z.B. aus Zigarettenrauch) zu metabolisieren (38).

### 2.1.3 Pathogenese

Die Entstehung einer Krebserkrankung setzt ein unkontrolliertes Wachstum entarteter Zellen voraus. Durch unterschiedliche Mutationen kommt es auf zellulärer Ebene zu einer Entkopplung von regulären Strukturen der Zellteilung und maligne Zellen wachsen unkontrolliert infiltrativ in das umliegende Gewebe. Sie besitzen auch die Fähigkeit zur Metastasierung. Grundsätzlich sind es körpereigene Zellen, die durch autonome,

überschießende Proliferation eine von der Norm abweichende Gewebestruktur bilden. Mutationen können durch innere und äußere Faktoren hervorgerufen werden. Für das HNSCC wurden einige Hauptrisikofaktoren nachgewiesen, bei denen das Entartungspotenzial erhöht ist (39).

Die Krebsentstehung generell ist ein komplizierter Prozess, der durch abnorme onkogene Signale ausgelöst wird und in einer genetischen Instabilität mündet. Die Anhäufung genetischer Variationen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen führt in einem mehrstufigen Prozess schlussendlich dann zum HNSCC. (40).

Verhaltensweisen wie Rauchen und Alkoholkonsum (Kanzerogene) triggern genetische Veränderungen in Tumorsuppressorgenen (APC-Gen, p53-Gen), Protoonkogenen, Onkogenen und weiteren Genen, die zelluläre Prozesse steuern. Es sind verschiedene Prozesse beschrieben, die an der Entstehung von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich beteiligt sind; hierzu gehören die fehlerhafte Chromosomensegregation und daraus resultierende numerische Chromosomenanomalien, eine veränderte Kopienzahl des Genoms, der Verlust der Heterozygotie, die Telomer-Stabilität, die Regulierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten, die unvollständige Reparatur von DNA-Schäden und Defekte in Signalwegen (40).

Es konnte auch bereits ein Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen und der Prognose der HNSCC-Patienten hergestellt werden, was dazu führen könnte, genetische Variationen zu Diagnose-/ Prognose-/ Screening- und Therapiezwecken zu nutzen (41).

Die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes ist ein mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel. Die verschiedenen histologischen Veränderungen des Plattenepithels im Verlauf der Karzinomentwicklung werden als intraepitheliale Plattenepithelläsionen (SIL) zusammengefasst. Dieser Begriff umfasst epitheliale Veränderungen von einer Plattenepithelhyperplasie, über Dysplasien bis hin zum Carcinoma in situ und wird in einer neuen Nomenklatur unterteilt in niedrig-/ mäßig-/ hochgradige intraepitheliale Neoplasien (15).

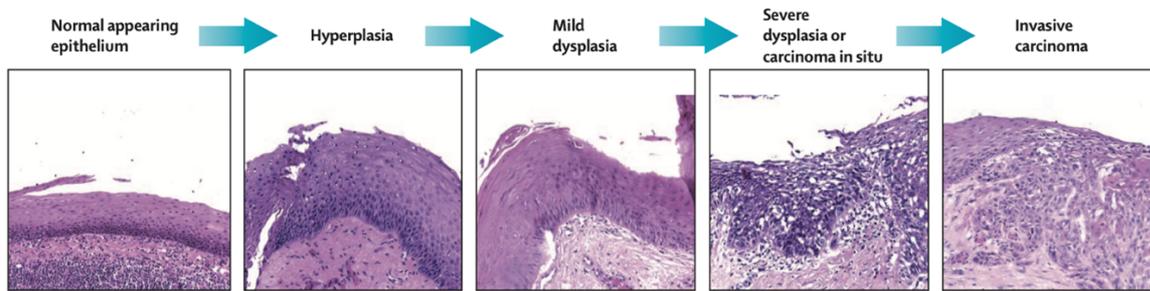


Abbildung 1: Karzinogenese (27)

Durch eine Reihe unabhängiger genetischer Veränderungen und darauffolgende Selektion der transformierten Epithelzellpopulationen kommt es dann in mehreren Stufen zum Übergang von einer normalen Schleimhaut zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom (SCC). In einigen Fällen sind die SIL reversibel, in anderen Fällen persistieren sie und/oder schreiten zu einem SCC fort. Vor allem solche als potenziell maligne eingeschätzten Läsionen entwickeln sich unter bestimmten Bedingungen (z.B. durch Risikofaktoren) deutlich häufiger zu invasiven Karzinomen (17, S.7).

#### 2.1.4 Klinik und Diagnostik

Da das Wachstum der Tumore zu Beginn meist schmerzlos und symptomarm verläuft, stellen sich Patienten meist erst nach einigen Wochen der Beschwerden zur Abklärung vor, was die Diagnosestellung und auch den Therapiebeginn oft erheblich verzögert (15, S.24). Verdächtig für ein Plattenepithelkarzinom ist jede Mundschleimhautveränderung mit Gewebeüberschuss oder -defekt, Farbveränderung oder Verhärtung. Ebenso kann initial bereits eine Zahnlockerung oder zervikale Lymphknotenschwellung vorliegen, im Verlauf kommt es dann nicht selten zu funktionellen Beeinträchtigungen der Mundöffnung, des Schluckens/Kauens/Sprechens, sowie zu Ernährungsstörungen und Schmerzen. Bei bis zu 40% der Patienten liegen bereits Hals-Lymphknotenmetastasen bei Erstdiagnose vor. Das klinische Erscheinungsbild variiert je nach Lokalisation des Tumors stark und beinhaltet außerdem Symptome wie Heiserkeit, Foetor, Blutungen, Taubheitsgefühl, Zahnverlust, Müdigkeit, Schwäche, Appetitlosigkeit und Gewichtsabnahme (15, S.26-27, 42).

Für das Plattenepithelkarzinom sind mehrere prä-maligne Veränderungen mit verschiedenen klinischen Erscheinungsformen beschrieben: hierunter fallen vor allem die orale Leukoplakie und die orale Erythroplakie. Als Leukoplakie bezeichnet man einen

weißen, nicht wegkratzbaren Fleck, der nicht als andere genauer definierte Veränderung (z.B. Candidiasis oder Lichen planus) eingestuft werden kann. Dieser weiße Fleck entsteht durch Verbreiterung der Hornschicht und betrifft ca. 3% der weißen erwachsenen Bevölkerung. Zumeist tritt diese Veränderung im mittleren Lebensalter und bei älteren Männern auf. Die häufigsten Lokalisationen der oralen Leukoplakie sind die Wangen- und Alveolarschleimhaut, sowie die Unterlippe. Seltenerer Läsionen am Mundboden, den lateralen Zungenanteilen und an der Unterlippe zeigen häufiger Atypien oder gar ein malignes Wachstum (17, S.8). Jede länger als zwei Wochen bestehende Schleimhautveränderung gilt als tumorverdächtig und sollte abgeklärt werden. Die Leukoplakie muss engmaschig, ggf. auch durch wiederholte histologische oder zytologische Untersuchungen auf ihre Dignität untersucht werden und bei dysplastischen Veränderungen komplett entfernt werden (15, S.22). 85% aller oralen prä malignen Veränderungen sind Leukoplakien, die meist einzeln, sowie überwiegend bei Männern und Rauchern auftreten. Homogene Leukoplakien haben in Summe ein niedrigeres malignes Potenzial als inhomogene bzw. verruköse; solche im Mundboden, am weichen Gaumen, an den lateralen und ventralen Flächen der Zunge haben das höchste maligne Potenzial. Bis zu einem Drittel aller Leukoplakien weisen in der histologischen Untersuchung eine Dysplasie, ein Carcinoma in situ oder ein invasives Karzinom auf (14).

Die orale Erythroplakie ist deutlich seltener als die Leukoplakie, hat jedoch ein höheres Entartungspotenzial. Unter einer Erythroplakie versteht man einen, vorwiegend bei älteren Männern vorkommenden, scharf begrenzten, weichen, roten Fleck, der sich zumeist am Mundboden, der ventralen und lateralen Zungenfläche, der retromolaren Region oder am weichen Gaumen befindet (17, S.10). Erythroplakien sind, im Gegensatz zu Leukoplakien, Hochrisiko-Läsionen, da die allermeisten Erythroplakien histologisch Dysplasien oder Plattenepithelkarzinome aufweisen (14). Weitere, seltene prä maligne Läsionen sind die orale submuköse Fibrose, sowie die orale Manifestation eines Lichen planus (14).

Als Screeningmethode für orale präkanzeröse Läsionen eignet sich primär die orale Inspektion und Palpation eines erfahrenen Arztes, weitere optische Hilfsmittel stellen die Gewebereflexion und die Autofluoreszenz dar. Die Früherkennung und frühe Behandlung verbessern die Prognose des Patienten (14, 15, S.24,27).

Zur Diagnostik beim HNSCC gehören neben der klinischen Untersuchung auch bildgebende Verfahren wie Ultraschall, CT/MRT, Röntgen-Thorax oder CT-Thorax. Zur Festlegung der lokalen Ausdehnung dient das CT/MRT ggf. mit Kontrastmittel, welches ebenso zur Detektion von Lymphknotenmetastasen für die Halsregion erfolgen sollte. Eventuell kann hierbei auch eine Ultraschall-gestützte Feinnadelbiopsie eines Lymphknotens oder ein FDG-PET/CT erfolgen. Bei besonderer Indikation, z.B. lokoregionär fortgeschrittenen Tumoren mit Operations-Indikation, kann ein FDG-PET/CT zum Ausschluss von Fernmetastasen genutzt werden. Bei fortgeschrittenem Tumorstadium (UICC III/IV) soll zum Ausschluss pulmonaler Metastasen oder eines Zweitumors ein Thorax-CT durchgeführt werden (15, S.28-34). Die häufigsten Lokalisationen von Fernmetastasen beim HNSCC sind die Lunge, mediastinale Lymphknoten, die Leber und Knochen (27).

Vor Therapiebeginn sollte in jedem Fall eine Tumorbiopsie mittels Inzisions- oder Bürstenbiopsie aus dem Randbereich der Läsion erfolgen (15, S.37). Die lichtmikroskopische Untersuchung einer so gewonnenen Gewebeprobe der SIL ist die verlässlichste Methode. Das Epithel kann hierbei aufgrund struktureller und zytologischer Veränderungen als dysplastisch eingestuft werden (17, S.11). Weiterhin können Läsionen eine Hyperkeratose, eine Hyperplasie mit/ohne Dysplasie, ein Carcinoma in situ oder ein invasives Plattenepithelkarzinom zeigen (14). Zum Ausschluss synchroner Zweitumore soll außerdem im Rahmen der Primärdiagnostik bei HNSCC eine HNO-ärztliche Spiegel-Untersuchung ggf. mit Endoskopie durchgeführt werden (15, S.26).

### 2.1.5 Therapie

Bei jeder Tumorthherapie wird zwischen einem kurativen und einem palliativen Ansatz unterschieden. Ziel des kurativen Ansatzes ist die vollständige Heilung des Patienten, beim palliativen Ansatz steht die Verbesserung der Lebensqualität durch eine gute Symptomkontrolle im Vordergrund. Bei beiden Ansätzen können sowohl die operative Therapie als auch die Strahlen- und Chemotherapie einzeln oder in Kombination zur Anwendung kommen. Grundsätzlich sollte jede Tumorthherapie interdisziplinär besprochen und im Konsens entschieden werden.

Die Therapie ist immer abhängig von der Lage und Größe des Tumors, vom Allgemeinzustand des Patienten, der voraussichtlichen behandlungsbedingten Morbidität, den funktionellen und ästhetischen Konsequenzen, sowie dem erwarteten

Behandlungserfolg. Ziel der Behandlung ist eine dauerhafte Tumorkontrolle bei geringen funktionellen Einschränkungen. Die Therapieentscheidung ist aktuell unabhängig von der Tumorgenese (HPV, Alkohol/Nikotin) (15, S. 42-43).

Kurativ kann bei HNSCC die alleinige Operation, die alleinige Radiotherapie, eine Radiochemotherapie oder die Kombination dieser Verfahren sein. Es konnte bisher keine Überlegenheit der primär chirurgischen Therapie gegenüber der primären Strahlentherapie nachgewiesen werden (15, S.42).

Das Ziel der operativen Therapie ist das vollständige Entfernen aller Tumorzellen aus dem Organismus mit einem definierten Sicherheitsabstand (R0-Resektion). Es sollte beim Mundhöhlenkarzinom ein histologisch nachweisbarer Sicherheitsabstand von 3-5 mm vorhanden sein. Zur Vermeidung von Tumorresten (R1-Resektion) kann gegebenenfalls ein intraoperativer Schnellschnitt erfolgen (15, S.38). Bei der chirurgischen Tumorbehandlung soll unabhängig vom klinischen Status der regionalen Lymphknoten und unabhängig von der lokalen Ausdehnung (T-Stadium) eine elektive/prophylaktische Neck-Dissection (Ausräumung der Lymphknoten des Halses; uni- oder bilateral) möglichst unter Erhaltung des Nervus accessorius angestrebt werden. Hierbei unterscheidet man die radikale von der selektiven Ausräumung. Bei gutem Allgemeinzustand des Patienten sollte bei kurativ resektablen Tumoren bei der Operation nach Möglichkeit die funktionelle Anatomie sofort bestmöglich rekonstruiert werden. Bei fortgeschrittenen Karzinomen sollte im Anschluss eine postoperative Therapie erfolgen (15, S.41). Die postoperative Therapie besteht vor allem bei pN1-Situation, hohem T-Stadium, R1-Situation, perineuraler Invasion oder Gefäßinvasion aus einer adjuvanten Radiochemotherapie, konventionell fraktioniert mit insgesamt 54-60 Gy über ca. 6 Wochen, bei erhöhtem Rezidivrisiko mit 66 Gy über 6,5 Wochen (15, S.45-47).

Häufig sind beim HNSCC die operativen Möglichkeiten aufgrund der anatomischen Ausdehnung des Tumors und dem angestrebten Funktionserhalt sehr eingeschränkt (27). Die Inoperabilität ist nicht genau definiert, meist zählen Chirurgen die Invasion der Arteria carotis, der Schädelbasis oder der prävertebralen Muskulatur zu den Entscheidungskriterien (27). Die konservative kurative Behandlung besteht aus einer Radio(chemo)therapie. Bei der Verabreichung der Strahlentherapie unterscheidet man zwischen konventionell fraktioniert (insgesamt 70 Gy, 5-mal/Woche 1,8-2 Gy), akzelerierter Fraktionierung und Hyper-/Hypofraktionierung. Als Kombinationspartner eignet sich eine Chemotherapie mit platinhaltigen Substanzen oder Cetuximab, die vor allem

bei fortgeschrittenen, inoperablen, nicht-metastasierten Karzinomen bei unter 70-Jährigen simultan bzw. neoadjuvant/adjuvant zur Strahlentherapie eingesetzt werden sollte (15, 43). Cetuximab zählt zur Gruppe der molekular-zielgerichteten Substanzen und hat als Antikörper eine inhibitorische Funktion auf den EGFR-Rezeptor, eine Rezeptor-Tyrosinkinase (44).

Die alleinige Chemotherapie wird beim HNSCC nur in palliativer Intention eingesetzt - neoadjuvant oder adjuvant zeigte die alleinige Chemotherapie keinen positiven Effekt. Das Risiko für Fernmetastasen konnte zwar im neoadjuvanten Setting gesenkt werden, für die lokoregionale Kontrolle und die Prognose erwies sie sich aber nicht als sinnvoll (27). Im Falle eines Rezidivs kann eine erneute kurative Operation und/oder Radiochemotherapie erfolgen (15).

In palliativer Intention kann bei inoperablem, rezidivierendem/metastasiertem HNSCC (R/M HNSCC) und gutem Allgemeinzustand als Erstlinien-Therapie eine Chemotherapie nach EXTREME-Schema mit Cis- bzw. Carboplatin, 5-Fluoruracil und Cetuximab erfolgen (1, 45); bei reduziertem Allgemeinzustand wird eher eine Monotherapie empfohlen, gegebenenfalls kommt auch eine palliative Bestrahlung/Operation in Frage. Nach Beendigung der eigentlichen Chemotherapie wird Cetuximab in Erhaltungsdosis weitergegeben; bei Versagen einer platinhaltigen Erstlinien-Therapie soll eine Zweitlinientherapie mit einem Checkpoint-Inhibitor durchgeführt werden. Auch bei Versagen unter/innerhalb von 6 Monaten nach einer adjuvanten platinhaltigen kurativen Therapie kann anstatt oder bei Kontraindikationen gegen ein erneutes Anwenden des EXTREME-Schemas eine Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren (z.B. Nivolumab) unabhängig vom PD-L1-Status erwogen werden. Alternativ wurden früher als palliative Zweitlinientherapie Taxane (Docetaxel), Methotrexat und Cetuximab eingesetzt (15, S.71-76). Bei Versagen aller medikamentösen Therapien in palliativer Intention werden Patienten nach „best supportive care“ behandelt.

Zusammengefasst besteht die Therapie früher Stadien (I und II) von HNSCC zumeist aus nur einer einzigen Säule, entweder der radikalen Operation oder der kurativen Strahlentherapie. In lokal fortgeschrittenen (III und IV) und/oder rezidivierenden/metastasierten Stadien ist die Therapie dann meist multimodal kombiniert lokal und systemisch und besteht entweder aus einer Operation mit adjuvanter Bestrahlung bzw. Radiochemotherapie oder alleiniger Radiochemotherapie (22, 27). Trotz dieser Therapien

kommt es leider beim lokal fortgeschrittenen HNSCC immer noch in bis zu 40% zu Lokalrezidiven und in ca. 25% zu Fernmetastasen (46).

Zum aktuellen Zeitpunkt ist, neben der platinbasierten Chemotherapie und Radiotherapie, die einzige zielgerichtete First-Line-Therapie im kurativen Ansatz von R/M HNSCC, die EGFR-Blockade mit Cetuximab. Die intensive Untersuchung von Immuncheckpoint-Inhibitoren, wie anti-PD-1-/anti-PD-L1-Antikörpern bietet einen weiteren zielgerichteten Therapieansatz. (46, 47).

#### 2.1.5.1 Immuntherapie

Unter Krebsimmuntherapie versteht man im weitesten Sinne jede Behandlung, die das körpereigene Immunsystem direkt oder indirekt moduliert und damit die Entwicklung, Aufrechterhaltung und/oder das Fortschreiten einer bösartigen Erkrankung beeinflusst. Hierdurch sollen gezielte antitumorale Immunreaktionen wiederhergestellt, ausgelöst oder zumindest gestärkt werden (11, 48).

Nachdem herausgefunden wurde, dass entartete Zellen in der Lage sind durch verschiedene Mechanismen der körpereigenen Immunantwort zu entkommen, ist die Immuntherapie heutzutage ein wichtiger Therapiebaustein verschiedener Tumorarten geworden (49). Zu Beginn zielten immuntherapeutische Ansätze darauf ab, aktive Immunzellen zu expandieren. Hierfür wurden peritumoral Zytokine injiziert, wovon man sich eine Erhöhung von Immunzellen am Ort des Tumorgeschehens erhoffte; später wurde dieser Mechanismus als Impfung weiterentwickelt, beides jedoch mit unzureichendem Erfolg. Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass Zytokine und Impfstoffe eine zu kurze Halbwertszeit für eine effektive Immunreaktion haben (50). Eine effektive Immunantwort setzt voraus, dass eine Reihe von immunologischen Kontrollpunkten durch das Vorhandensein von stimulierenden Signalen und die Vermeidung von hemmenden Signalen passiert werden. Krebszellen können antitumorale Immunantworten durch die Stimulierung von inhibitorischen Signalwegen reduzieren. Die wichtigsten Beispiele für solche hemmenden Immunkontrollpunkt-Rezeptoren sind das Zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (CTLA-4) und der Programmierte-Zelltod-Rezeptor 1 (PD-1) (11).

Durch Blockade des PD-1-/PD-L1-Signalweges sowie von CTLA-4 soll die krebsinduzierte Immunsuppression wieder rückgängig gemacht werden (46). Seit einigen Jahren schon wird das klassische Therapiespektrum, vor allem bei fortgeschrittenen

Tumorleiden, durch die Immuncheckpointblockade als zusätzliche oder alleinige Behandlungsoption regelhaft ergänzt (51).

Bei der medikamentösen Checkpoint-Blockade gelten monoklonale Antikörper als Mittel der Wahl: ein Antikörper ist ein vom Immunsystem synthetisiertes Protein, das die Fähigkeit zur Erkennung eines bestimmten Zielproteins besitzt. Antikörper haben verschiedene Funktionen bei der Regulation des Immunsystems: sie triggern das Immunsystem, fungieren aber auch als Kontrollpunkt-Inhibitoren. Ein monoklonaler Antikörper ist ein identischer Klon eines spezifischen Antikörpers mit der gleichen Funktion (2). Medikamentös genutzte Antikörper sind Immunglobuline, die intravenös verabreicht werden müssen, eine niedrige Clearance und somit eine lange Halbwertszeit von mehreren Wochen inne haben (26).

Der Vorteil der Immuntherapie verglichen zur konventionellen Chemotherapie liegt in der höheren Spezifität. Die traditionelle Chemotherapie zielt generell und wenig spezifisch auf schnell proliferierende Zellen in bestimmten Phasen des Zellzyklus ab, wodurch es häufig ebenso zu einer Schädigung benignen Zellen und einer erhöhten Morbidität des Patienten kommt. Dies ist ein Grund, weshalb sich viele Patienten aufgrund ihres Gesundheitszustandes nicht für eine Radiochemotherapie eignen (52). Im Gegensatz dazu stärken die meisten Immuntherapeutika das körpereigene Immunsystem, um die als entartet erkannten Zellen zu bekämpfen. Hierbei macht man sich auch langfristige Effekte solcher Therapien zunutze, bei denen das Immunsystem-Gedächtnis gelehrt wird, eine Tumorstabilität bzw. -remission, auch ohne dauerhafte Zuführung eines Medikamentes, aufrecht zu erhalten (48).

Die häufigste molekular zielgerichtete Therapie beim HNSCC ist der seit 2016 eingesetzte EGFR-Antagonist Cetuximab (51). Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) führt bei Bindung des zugehörigen Liganden über einen intrazellulären Signalweg zur Erleichterung der Zellproliferation, Behinderung der Apoptose, Förderung der Angiogenese und Aktivierung der Invasion und Metastasierung. Der EGFR ist bei bis zu 90% der HNSCC überexprimiert, wodurch es nachweislich zu einer schlechteren Prognose und Strahlenresistenz kommt. Cetuximab blockiert als Anti-EGFR-Antikörper diese onkogenen Signalwege und führt darüber hinaus zur Induktion einer antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität. Alle anderen getesteten EGFR-Inhibitoren, VEGF-Inhibitoren, sowie weitere Multikinase-Inhibitoren zeigten bisher keine deutlichen Erfolge zur Verbesserung der Krebstherapie (46). Als Ersatz für Cisplatin

eignet Cetuximab sich in diesem Setting jedoch nicht, die Monotherapie kommt bisher nur als Zweitlinientherapie nach Versagen von Checkpoint-Inhibitoren zum Einsatz (53). Insgesamt führt der Zusatz von Cetuximab zur platinbasierten Chemotherapie jedoch nur zu einer Verlängerung der Überlebenszeit um 2,7 Monate (45, 54).

Diese unbefriedigenden Ergebnisse machen es stets wichtiger, effektive Zweitlinientherapien herauszuarbeiten. Einige Tumorentitäten zeigten sich sogar refraktär auf eine konventionelle Radio-/Chemotherapie. In der letzten Zeit wurden enorme Fortschritte im Verständnis der Rolle der menschlichen Immunantwort bei der Beeinflussung des Tumorwachstums und -therapieansprechens gemacht (55).

Bereits im Zusammenhang mit einer (Radio)chemotherapie zeigt sich das Immunsystem in der Lage die Anti-Tumor-Reaktion durch Veränderung der Tumor-Mikroumgebung zu beeinflussen (56). Die Radiotherapie ist in der Lage, zusätzlich zur lokalen Reduktion der Tumormasse durch DNA-Schädigung und darauffolgende Tumorzellnekrose bzw. -apoptose, die systemische Anti-Tumor-Immunantwort über sogenannte abkopale Effekte zu stärken. Zuerst wird lokal das an den Tumor angrenzende Gewebe dazu gebracht Entzündungsmediatoren freizusetzen und Immunzellen anzulocken, dann kommt es zu einer Verbesserung der T-Zell-vermittelten Immunität, die zur immunvermittelten Regression von Metastasen außerhalb des Bestrahlungsfeldes führen kann (2, 51, 54, 57).

Vor Therapiebeginn wirkt meist das Phänomen der Immunevasion diesen Antitumormechanismen entgegen: häufig liegen immunologisch „kalte“ Tumore vor, die Immuninfiltrate im Tumorgewebe (v.a. zytotoxische T-Zellen) verhindern. Durch die Radio- und Chemotherapie lassen sich „kalte“ Tumore in „heiße(re)“ umwandeln. Mithilfe der damit kombinierbaren Immuncheckpoint-Blockade können dann tumorassoziierte immunhemmende Mechanismen zusätzlich ausgeschaltet werden (51).

Die niedrig dosierte systemische Chemotherapie stimuliert sowohl das adaptive als auch das angeborene Immunsystem: sie löst Zellveränderungen bei sterbenden Tumorzellen aus, die sie für das Immunsystem angreifbarer macht und mobilisiert zukünftige antigenpräsentierende Zellen aus dem Knochenmark (54). Auch platinhaltige Chemotherapeutika induzieren immunreaktive Effekte durch Verstärkung der T-Zell-Aktivierung, verstärkte MHC-Expression und Tumorantigenpräsentation (51, 58) und Induktion der PD-L1-/PD-L2-Expression (59, 60).

Die Tumorzell-Immunzell-Interaktion kann medikamentös zugunsten der Immunantwort durch Checkpoint-Inhibitor-Antikörper, z.B. gegen den PD-1/PD-L1 Signalweg, verschoben werden, indem sie die inhibitorische Interaktion verhindern und die T-Zell-Funktion wieder verbessern (2).

Aufgrund der zahlreichen vielversprechenden Studien zur Checkpoint-Blockade wurden in den letzten Jahren immer mehr Immuncheckpointinhibitoren identifiziert. Der erste Checkpoint-Inhibitor (Ipilimumab, anti-CTLA-4-AK) wurde 2011 zur Therapie des fortgeschrittenen Melanoms von der FDA zugelassen. Im Jahr 2015 zeigte dann erstmals Nivolumab (anti-PD-1-AK) Erfolg bei der Therapie von Melanomen. Im darauffolgenden Jahr wurden dann auch Atezolizumab (anti-PD-L1-AK) und Pembrolizumab (anti-PD-1-AK) in den USA zugelassen. Insgesamt zeigen alle diese Medikamente nennenswerte Erfolge bei vertretbarem Nebenwirkungsprofil.

Bei einigen Tumoren sind sie schon fester Bestandteil der Erst- und Zweitlinientherapie geworden. Eine Vielzahl klinischer Studien für Darmkrebs, Blasenkrebs, Nierenzellkarzinome, Tumore im Kopf-Hals-Bereich und Magen-Darm-Trakt werden derzeit mit guten Zwischenergebnissen durchgeführt. Nivolumab und Pembrolizumab wurden 2017 von der EMA für Patienten zugelassen, die an einer rezidivierenden oder metastasierenden Form eines (PD-L1-positiven) Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und Halses (HNSCC) mit Krankheitsprogression nach einer platinbasierten Chemotherapie leiden (10, 47, 55, 60, 61). 2019 folgte dann die Zulassung der Pembrolizumab-Monotherapie auch bei platin sensitiven PD-L1-positiven R/M HNSCC-Patienten (46, 47). Sowohl Pembrolizumab als auch Nivolumab waren einer Single-Agent-Chemotherapie beim vorbehandelten R/M HNSCC hinsichtlich des Gesamtüberlebens überlegen, bei weniger schweren Nebenwirkungen. Bei Pembrolizumab zeigte sich im Gegensatz zu Nivolumab eine bessere Wirksamkeit bei PD-L1-Positivität. Trotz einer Verbesserung der Lebensqualität (vor allem durch Stabilisation der Symptome und Körperfunktionen) verglichen zu einer Chemotherapie (10, 26, 62), wurde insgesamt keine Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens erzielt (62-64).

Auch bei unbehandelten lokal fortgeschrittenen HNSCC als First-Line-Therapie war die Pembrolizumab-Therapie sowohl als Mono- als auch als Kombinationstherapie mit der konventionellen Chemotherapie dem EXTREME-Schema nicht unterlegen. Als positive Effekte zeigten sich jedoch erneut die längere Wirkdauer und die geringeren Nebenwirkungen, auch hier vor allem bei PD-L1-Positivität (46, 65).

Weitere monoklonale Antikörper wie Durvalumab oder Avelumab (anti-PD-L1) sind Gegenstand aktueller Forschung (46). Auch hier scheint die Wirksamkeit vor allem bei PD-L1-Positivität als Zweitlinien-Therapie gegeben zu sein (47, 66-69). Avelumab soll vor allem als Induktor einer frühen Immunantwort vor/während der Radiochemotherapie fungieren (70).

Für die Primärbehandlung von lokal fortgeschrittenen, aber nicht rezidivierenden/metastasierten HNSCC liegen noch keine ausreichenden Studienergebnisse vor. Hierbei werden Immuncheckpoint-Inhibitoren vor allem als Augmentation für die Standard-(Radio)chemotherapien und/oder Operation eingesetzt (46).

In einer Metaanalyse aus dem Jahre 2020 wurden verschiedene Immuntherapeutika, wie z.B. Anti-PD-1-Antikörper (Pembrolizumab, Nivolumab) und PD-L1-Inhibitoren (Durvalumab und Atezolizumab) als alleinige Therapie und teils auch in Kombination mit einer Chemotherapie bei rezidivierenden bzw. metastasierten HNSCC bezüglich des Gesamtüberlebens analysiert. Alle randomisierten kontrollierten Studien zeigten ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben nach Behandlung mit einer Immuntherapie verglichen zur Kontrollgruppe. Das mediane Gesamtüberleben lag kumuliert hier bei 8,2 Monaten und die erwartete Rate der Überlebenden nach einem Jahr bei 36%. Bei PD-L1-exprimierenden HNSCC zeigte sich ein besseres Gesamtüberleben als bei PD-L1-negativen Tumoren, was darauf zurückzuführen ist, dass sich exprimierende Tumorzellen der T-Zell-Aktivität entziehen (1).

Trotz nachgewiesenermaßen monatelanger Wirkdauer der Immuntherapien sind die Ansprechraten zum aktuellen Zeitpunkt noch auf nur ca. 10-20% der infrage kommenden HNSCC-Patienten begrenzt und die Wirkung setzt teilweise mit großer Verzögerung und gegebenenfalls sogar mit initialer radiologischer Progression trotz klinischen Ansprechens ein (51, 55, 60, 71, 72). Die Gründe für das Nichtansprechen auf eine Immuntherapie werden auf mehrere Faktoren zurückgeführt: unzureichende Infiltration bzw. variable Populationen aktivierter Immunzellen in der Mikroumgebung des Tumors, Hypoxie und Mutationen spezifischer Signalwege (55).

Somit haben HNSCC meist nur eine gering- bis mittelgradige Immunogenität und liegen meist als „kalte“ Tumore vor. Bei HPV-positiven Tumoren sind häufiger „heiße“ und somit „aktive“ Tumormikroumgebungen zu finden, was zu einem signifikant besseren Ansprechen auf verschiedene Therapieoptionen, wie auch einer Immuncheckpointblockade führt. Dies ist zurückzuführen auf eine höhere Anzahl von

tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten und die damit höhere Chance mithilfe einer Immuntherapie eine T-Zell-Reaktivierung zu erreichen. Als neue vielversprechende Therapieoption könnten multimodale Kombinationen von Immuncheckpointblockade mit immunstimulatorischen Substanzen oder -therapien gelten (13, 51, 73-75).

Im Verlauf einer solchen Kombinationstherapie kommt es in sehr seltenen Fällen zu einer vorübergehenden radiologisch sichtbaren Vergrößerung von Tumorherden. Dies nennt man Pseudoprogression und ist zurückzuführen auf eine Infiltration des Tumorgewebes durch Immunzellen und eventuell intratumoral entstandene Ödeme und Nekrosen infolge der Immuntherapie. Zur Differenzierung einer Pseudoprogression von einer echten Progression ist entscheidend, dass eine immunologisch herbeigeführte Pseudoprogression in der Regel nicht mit einer klinischen Verschlechterung einhergeht. Ebenso könnte die gezielte Markierung intratumoraler Immunzellen durch Immun-PET-Ansätze Aufschluss darüber bringen. In Zukunft wäre es wünschenswert neue, verlässliche Biomarker bzw. Prädiktoren zu identifizieren, die bereits vor und während einer eingeleiteten Therapie Rückschlüsse auf das Ansprechen des Tumors zulassen (7, 51). Die für das Ansprechen einer zytotoxischen Chemotherapie definierten RECIST-Kriterien setzen bei Therapieansprechen eine Verkleinerung der Tumormasse voraus, was bei Immuntherapeutika vor allem zu Beginn teils nicht der Fall ist (54). Die RECIST-Kriterien sind ein standardisierter Algorithmus, um das Tumoransprechen bzw. die Tumorprogression in klinischen Studien zu beschreiben (76). Für die Immuntherapie wurden diese Ansprechkriterien modifiziert, was schlussendlich zu den neueren iRECIST (immune-modified RECIST) geführt hat, welche das aufgrund einer Pseudoprogression häufig beobachtete Abbrechen der Immuntherapie verhindern soll (77, 78).

Sobald die Immunkontrollpunkte blockiert sind, wird auch das Gleichgewicht zwischen der Autoimmunität und der Immuntoleranz gestört. Der Begriff immunbedingte Nebenwirkungen (IMAR) beschreibt die Nebenwirkungen der neuen Immuntherapien (55). Die heutzutage etablierten Immuntherapien haben hauptsächlich Nebenwirkungen wie Hautreaktionen und Störungen des Hormonsystems, die im Vergleich zur Standardtherapie insgesamt seltener vorkommen (1, 7, 71). Die häufigsten Nebenwirkungen sind: Hautstörungen/Juckreiz, Müdigkeit, Hautausschlag, Schwindel, Appetitlosigkeit, gastrointestinale Ereignisse und Durchfall, sowie Endokrinopathien. Speziell bei PD-1/PD-L1-Inhibitoren kam es zu immunbezogenen unerwünschten Ereignissen, die

mit Diarrhöe, Colitis, Pankreatitis und neurologischen, sowie hämatologischen Nebenwirkungen und Pneumonitis assoziiert sind. Die länger dauernde Behandlung kann auch zu schweren Immunreaktionen wie Veränderungen der Leberenzymwerte (AST und ALT) führen (55, 71). Im Gegensatz dazu stehen Nebenwirkungen wie gastrointestinale Beschwerden/Diarrhoen, Asthenie, Schleimhautentzündungen, Haarausfall, Niereninsuffizienz und Anämie bei einer konventionellen Chemotherapie (1, 54).

Durch die Effekte einer Immuntherapie, wie beispielsweise die Tumormassenreduktion, würde sie sich bei Kopf-Hals-Tumoren auch besonders im (neo)adjuvanten Setting eignen (46). Man könnte die funktionellen und ästhetischen Folgen der daran anschließenden Therapien verbessern. Es zeigte sich bei neoadjuvant mit Nivolumab bzw. Pembrolizumab behandelten HNSCC-Patienten in bis zu 50% eine Reduktion der Tumormasse. Im Anschluss an eine Standardtherapie könnten adjuvant eingesetzte Immuntherapeutika auch das Risiko für die Entwicklung eines Rezidivtumors mindern (48, 79).

Immuntherapien haben zusammenfassend das Potenzial, solide Tumore zu verkleinern, eine Metastasierung zu hemmen und das Überleben der Patienten insgesamt zu verbessern. Der Trend geht aufgrund der guten Verträglichkeit der Immuntherapeutika nunmehr zu Kombinationstherapien mit anderen Medikamenten (andere Checkpoint-Inhibitoren, Kinase-Inhibitoren, Chemotherapeutika und Targeting-Agenzien) bzw. Therapieoptionen (Radiatio) (9, 10, 47, 54, 55). Hierbei setzt man auf systemische Effekte lokaler Bestrahlung und gegenseitige Verstärkung der Wirkung von Immun- und Chemotherapeutika, welche dann im Verlauf zur Aktivierung körpereigener Antitumorimmunmechanismen führen sollen (7, 51, 54).

Ein weiterer Einsatz für die Checkpoint-Inhibitoren wäre beispielsweise zum Bahnen einer Chemotherapie, da die Ansprechraten einer Chemotherapie in der Vergangenheit deutlich höher lagen, wenn die Patienten vorher mit Checkpoint-Inhibitoren behandelt wurden (80). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die Wiederherstellung der Chemosensitivität durch die Immuntherapie-induzierte Veränderung der Mikroumgebung des Tumors und die gleichzeitige Anwesenheit von Chemo- und Immuntherapeutikum aufgrund der langen Halbwertszeit von Antikörpern (60).

Aufgrund der hohen Kosten dieser Behandlungen und angesichts der Tatsache, dass nur bei einigen wenige Patienten eine gute Ansprechbarkeit gegeben ist, bzw. die Vorteile einer Immuntherapie überwiegen, ist es wichtig, die Entwicklung von prädiktiven

Biomarkern zu intensivieren, um die fortgeschrittene zielgerichtete Therapie auf die Patienten zu konzentrieren, die am ehesten davon profitieren (46, 55). Eine alleinige Immuntherapie (Nivolumab) beim fortgeschrittenen HNSCC ist mehr als doppelt so teuer wie die konventionellen Standardtherapien, bringt aber den Patienten insgesamt mehr qualitätskorrigierte Lebensjahre (QALY), was insgesamt zu einer positiven Kosten-Nutzen-Berechnung führt (81).

Durch die Identifizierung von geeigneten Patienten vor Therapiebeginn könnte man auch verhindern, Patienten einer Immuntherapie und ihren möglichen Nebenwirkungen auszusetzen, ohne dass diese überhaupt auf das Medikament ansprechen (54). Da viele Immuntherapeutika Effektor-T-Zellen als Angriffspunkt haben, könnte durch Medikamente zur Detektion dieser Zellen als Kombinationspartner für konventionelle Immuncheckpointinhibitoren die Immuntherapie von HNSCC deutlich verbessert werden (61).

Weitere immuntherapeutische Ansätze umfassen Impfstoffe gegen Krebs oder Designer-Immunzellen. (48) Bei der Erforschung der möglichen Impfstoffe versucht man eine Immunisierung mit zugeführten Tumorantigenen zu erreichen. Unter der adoptiven Immuntherapie versteht man die passive Übertragung ex vivo erzeugter immunologisch aktiver Zellen (meist T-Lymphozyten) in den Organismus, um direkt oder indirekt eine Tumorrückbildung zu erreichen (75, 82).

#### 2.1.6 TNM-Klassifikation, Grading/Staging

Das TNM-Klassifikationssystem der UICC teilt die klinischen Krebsstadien nach der Tumorgöße und Tiefe der Invasion (T), dem Vorhandensein und der Ausdehnung regionaler Lymphknotenmetastasen (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) ein (83). Man unterscheidet die klinische Klassifikation (cTNM) von der pathologischen Klassifikation (pTNM): die klinische Klassifikation ergibt sich prätherapeutisch aus den Befunden der Untersuchungen und ist wichtig für die Auswahl der Therapie; die pathologische Klassifikation basiert auf der postoperativen histopathologischen Untersuchung des Tumorgewebes und ist wichtig für die Indikation zur adjuvanten Therapie und die Prognose (84, S.7).

Tabelle 1: Tabelle TNM-Klassifikation Kopf-Hals-Tumore (Lippe, Mundhöhle, Pharynx, große Speicheldrüsen), modifiziert nach (84)

T-Primärtumor	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	≤2cm
T2	>2cm bis 4cm
T3	>4cm
T4	Primärtumor mit Invasion in Nachbarorgane
N-regionäre LK	
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, ≤3cm
N2	Metastase(n) in ipsilateralen oder kontralateralen LK >3cm ≤6cm
N3	Metastase(n) in LK >6cm
M-Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: Histopathologisches Grading (84, S.24)

GX	Differenzierungsgrad nicht bestimmbar
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	undifferenziert

Tabelle 3: Residualtumor (84, S.19)

RX	Nicht beurteilbar
R0	Kein Residualtumor

R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Tabelle 4: Stadiengruppierung nach UICC (84, S.28,34,35,53)

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1/T2	N1	M0
	T3	N0/N1	M0
Stadium IVa	T1-3	N2	M0
	T4a	N0-2	M0
Stadium IVb	Jedes T	N3	M0
	T4b	Jedes N	M0
Stadium IVc	Jedes T	Jedes N	M1

## 2.2 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem hat grundsätzlich zwei Hauptfunktionen: erstens Selbst von Fremd zu unterscheiden und zweitens eine adäquate Antwort auf fremde Krankheitserreger und abnorme Zellen in Gang zu setzen, um sie schlussendlich zu eliminieren (2). Die Immunantwort besteht aus zwei Teilgebieten: der humoralen und der zellulären Komponente. Die humorale Komponente agiert mittels von B-Zellen sezernierter Antikörper, die zelluläre Komponente (B- und T-Lymphozyten) ist zuständig für die Erkennung von Antigenen, die Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen und T-Lymphozyten, die T-Zell-Proliferation und somit die Ausrottung vor allem intrazellulärer Erreger bzw. entarteter Zellen (85).

Es lassen sich zwei Bereiche unterteilen: das angeborene/unspezifische und das erworbene/spezifische Immunsystem. Das angeborene Immunsystem eliminiert schnell und zuverlässig Körperfremdes, agiert jedoch wenig spezifisch und hat keine Gedächtnisfunktion. Hierzu gehören Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Komplementfaktoren, Zytokine und Akute-Phase-Proteine (86). Das erworbene Immunsystem besteht hauptsächlich aus T- und B-Zellen und beinhaltet eine gerichtete Antwort auf spezifische Antigene, welche mittels eines MHC-Moleküls präsentiert werden. Zur Aktivierung von T-Zellen benötigt es immer zwei Signale:

das erste Signal wird vom T-Zell-Rezeptor durch das Erkennen eines von APC mittels MHC-präsentierten (Tumor-)Antigens ausgelöst, das zweite Signal ist entweder ein kostimulatorisches (z.B. CD28) oder koinhibitorisches Signal. Zur Vermeidung einer Autoimmunität exprimieren Immunzellen auch inhibitorische Rezeptoren (Immunkontrollpunkte/Checkpoints – z.B. PD-1), die die Immunantwort hemmen können (54, 87).

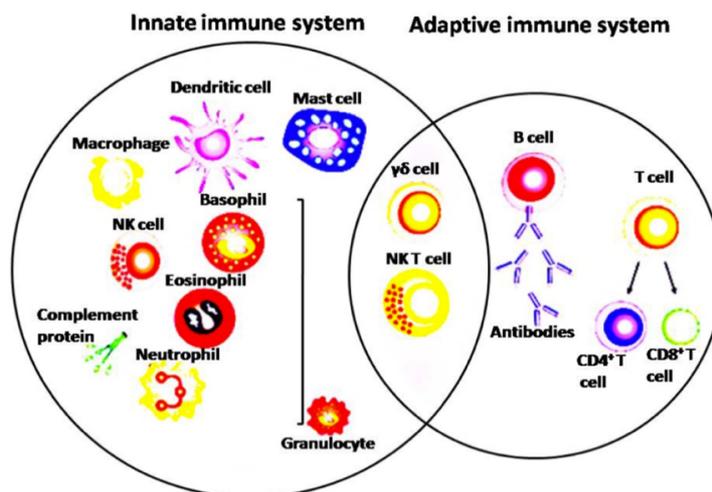


Figure 2. Depicture of cells in the innate and adaptive immune system

Abbildung 2: angeborenes und erworbenes Immunsystem (85)

### 2.2.1 Zelluläre Immunantwort

Der wichtigste Bestandteil des zellulären Immunsystems (zur Tumorbekämpfung) sind die T-Lymphozyten (82). T-Lymphozyten, die durch den allgemeinen T-Zell-Marker CD3 erkannt werden, werden grob in CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxische T-Zellen unterteilt. Die CD4+ T-Zellen produzieren eine Reihe von Zytokinen, die die Funktion benachbarter Immunzellen modulieren und Entzündungszellen anlocken (83). CD8+ T-Zellen entwickeln sich nach Antigenstimulation zu T-Effektorzellen, die Krebszellen abtöten können. Im späteren Verlauf gehen einige von ihnen in Apoptose und der Rest differenziert sich zu T-Gedächtniszellen (7).

Die Aktivierung der T-Zellen und die darauffolgende Proliferation und Differenzierung erfordert eine Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) durch die Bindung eines spezifischen Antigens, welches der T-Zelle mithilfe von MHC-Molekülen von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert wird (88). Es gibt zwei unterschiedliche Arten von MHC-Molekülen; MHC-1-Moleküle sind auf allen kernhaltigen Zellen zu finden und präsentieren (Tumor-)Antigene vom Zellinneren auf die Zelloberfläche um anschließend von

zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oder NK-Zellen erkannt zu werden – abnorme Zellen werden dann mittels Zytolyse eliminiert; MHC-2-Moleküle sind nur auf spezialisierten APC zu finden und präsentieren aufgenommene Antigene den CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, die daraufhin andere Immunzellen anlocken können (2, 82, 86).

T-Zellen haben nach ihrer Aktivierung das Potenzial, Krebszellen effektiv und spezifisch abzutöten. Dies geschieht über die Freisetzung von Perforin, Granzymen, Interferon  $\gamma$  und TNF- $\alpha$  von zytotoxischen T-Zellen (85). Schreitet ein Tumorgeschehen fort, spricht man von einer Erschöpfung der T-Zell-Funktion, die durch eine Abnahme der T-Zell-Proliferation, der Zytokinproduktion und der zytotoxischen Funktion gekennzeichnet ist. Diese wird, zumindest zu einem gewissen Teil, aufgrund anhaltender Antigenstimulation durch hemmende Rezeptor-Ligand-Interaktionen zwischen tumorreaktiven T-Zellen und Tumorzellen ausgelöst (z.B. CTLA-4, PD-1) (89).

Eine adäquate Immunreaktion wird durch ein ständiges Kontrollsystem überwacht, das aus einer Vielzahl von stimulierenden und hemmenden Proteinen besteht. Hemmende Rezeptoren auf T-Zellen, auch Checkpoints genannt (z.B. PD-1), regulieren physiologisch die Aktivierung und Funktion zytotoxischer T-Lymphozyten, um die immunologische Selbsttoleranz aufrechtzuerhalten und die umliegende Gewebeschädigung als Folge der Immun- und Entzündungsreaktion zu minimieren. Einige Tumorzellen haben die Fähigkeit entwickelt den Körper mittels Expression eines dazu passenden Liganden (z.B. PD-L1) zu täuschen und ihm fälschlicherweise Selbsttoleranz abzuverlangen, um dem Angriff des Wirts-Immunsystems zu entkommen (2, 55).

Dieser dysfunktionale Zustand zytotoxischer T-Zellen kann mithilfe einer Checkpointrezeptor-Blockade rückgängig gemacht werden (54, 55). Viele neuartige Immuntherapien zielen somit auf die Wiederherstellung der T-Zell-Funktion zur Tumorabwehr ab (89).

Das für diese Arbeit wichtigste Beispiel für eine tumorinduzierte Immunsuppression ist das Checkpoint-Molekül PD-1 und seine Liganden PD-L1 und PD-L2.

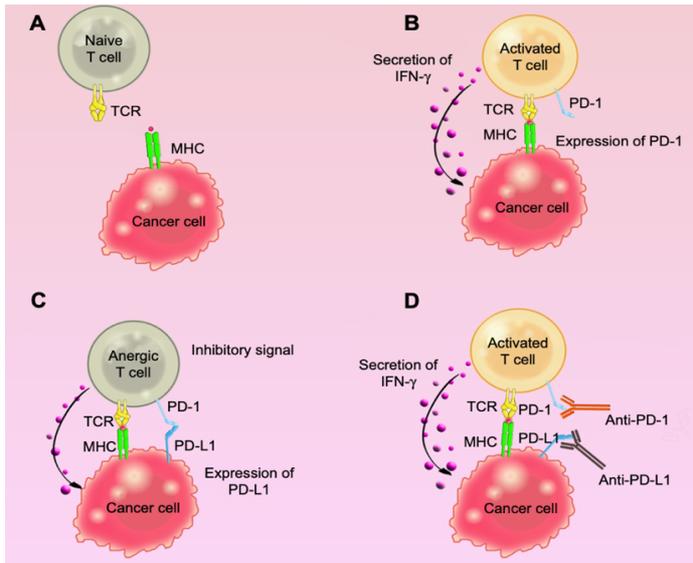


Abbildung 3: Reaktivierung der Anti-Tumor-Immunantwort durch Checkpoint-Inhibitoren (9)

B-Lymphozyten sind zuständig für das längerfristige Immunsystem, indem sie nach der Bindung eines Antigens an ihren Rezeptor zu Plasmazellen differenzieren und antigenspezifische Antikörper produzieren. B-Zellen fungieren jedoch auch als Antigen-präsentierende Zellen, fördern die Differenzierung von T-Zellen und töten Krebszellen direkt durch Freisetzung von Granzym B ab (83).

### 2.2.2 Tumormikroumgebung

Unter der Tumormikroumgebung (TME) versteht man eine Matrix aus Krebszellen, Stromazellen (Fibroblasten), Immunzellen und immunmodulierenden Zytokinen (2, 10). Dieses Milieu spielt eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese und der Tumorentwicklung (33, 90), da dieses dem Tumor das Wachstum, die Invasion, die Migration und die Metastasierung erleichtert (10). Hierbei werden bei soliden Tumoren zwei Hauptgruppen von TME unterschieden: die entzündlichen und die nicht-entzündlichen Tumore. Entzündliche Tumore locken zytotoxische T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen durch verschiedene Signale und Zytokine an, die dann teilweise im Tumormikromilieu ihre Funktion verlieren. Besonders entzündliche Tumore bieten aber aufgrund des generellen Vorhandenseins von Immunzellen am Wirkort einen guten Angriffspunkt für Immuntherapien, die den Immunzellen ihre Funktion zurückgeben. Bei nicht-entzündlichen Tumoren scheint die Immuninsuffizienz die Hauptursache für die Progression zu sein (2, 91).

HNSCC sind dafür bekannt, mit einer hohen Infiltration mit Immunzellen einherzugehen, was vermutlich an ihrer Nähe zum immunologisch bedeutsamen Waldeyer'schen Rachenring und ihrer teils infektiologisch getriggerten Ursache liegt. Bereits vor 40 Jahren wurden schon tumorinfiltrierende Lymphozyten beschrieben, 10 Jahre später wurden dann die Subpopulationen genauer charakterisiert (50, 92, 93).

Die wichtigsten Immunzellen der TME werden zusammengefasst als tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL). Die Zusammensetzung der infiltrierenden Immunzellen scheint sowohl ein Prädiktor für die Prognose zu sein (54, 90), als auch einen Einfluss auf das Therapieansprechen mit Checkpoint-Inhibitoren zu haben (94). Eine hohe Anzahl TIL ist häufig mit einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert (95, 96). Da die Antitumorwirkung der Immuncheckpoint-Hemmung durch CD8+-T-Zell-Zytotoxizität vermittelt wird, ist ein bereits vorhandenes T-Zell-Infiltrat oder eine erfolgreiche Migration dieser Zellen innerhalb eines Tumors theoretisch eine Mindestvoraussetzung für ein adäquates Therapieansprechen. Durch Induktion von CD8+-T-Zellen kann es zu einer Verbesserung der Anti-Tumor-Reaktion kommen (73).

Die Anzahl und Zusammensetzung der TIL scheint abhängig von der lokalen Tumorausdehnung (93), dem HPV-Status, der PD-L1-Expression und der Risikofaktor-Exposition (97) zu sein (96).

Eine weitere wichtige Sorte angeborener Immunzellen in der Tumorumgebung stellen Makrophagen dar: die Makrophagen des protumoralen M2-Phänotyps (CD163+) fördern die Gewebetransformation, die Tumorprogression, die Angiogenese und die Metastasierung. Ob eine erhöhte Anzahl von M2-Makrophagen somit zu einer schlechteren Prognose führt bzw. ob diese Immunzellen eine hohe Relevanz bei der Progression haben, wird kontrovers diskutiert (74). Demgegenüber stehen die proinflammatorischen M1-Makrophagen, die eher für eine Anti-Tumor-Reaktion stehen (85).

Auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) kommen in der Tumormikroumgebung vor und stellen eine wichtige Säule der Anti-Tumor-Reaktion dar. NK-Zellen gehören morphologisch zu den Lymphozyten, agieren aber nicht antigenspezifisch. Sie erkennen und eliminieren abnorme Zellen nach erfolgter Markierung durch Antikörper oder aufgrund des Fehlens von MHC-1 (86). Krebszellen sind in der Lage die Aktivität dieser NK-Zellen durch geringere Expression von MHC-Molekülen und hohe PD-L1-Expression zu unterdrücken (98).

Die in dieser Arbeit mittels Immunhistochemie bestimmten Zelltypen der Tumormikroumgebung sind: allgemein T-Lymphozyten mittels CD3, T-Helferzellen mittels CD4, zytotoxische T-Lymphozyten mittels CD8, Natürliche Killerzellen mittels CD56, Makrophagen mittels CD68 (tumorassoziierte Makrophagen – TAM) (99). Sowohl die Analyse von PD-1 und PD-L1 als auch die der Immunzellen in der Tumorumgebung könnten wichtige Prädiktoren für das Therapieansprechen auf Immuntherapeutika und das Überleben von HNSCC-Patienten sein (97).

### 2.2.3 Immunantwort bei Tumorgeschehen

Bereits vor über 50 Jahren wurde erstmals die Rolle des Immunsystems bei Tumorerkrankungen beschrieben. Es wurde als ein „Wächter“ beschrieben, der Krebszellen aufspüre und eliminiere, was zum Begriff der „Immunüberwachung“ führte (100). Heutzutage geht man eher von einem komplexen System des Immunoeditings aus (101); hierunter versteht man die Interaktion zwischen Krebszellen und dem Immunsystem, bei der entartete Zellen abgetötet werden sollen, einige es aber schaffen dem Immunsystem zu entkommen. Durch diese Selektion von Tumorzellen ist das Immunsystem auch in der Lage die Tumoreigenschaften zu beeinflussen. Das Immunoediting geschieht in drei Phasen: Eliminierung, Gleichgewicht und Flucht. Bei der Eliminierung erkennen das angeborene und erworbene Immunsystem Tumorzellen anhand ihrer Antigene und eliminieren sie bestmöglich, darauf folgt die Gleichgewichtsphase, in der gering immunogene Krebszellen im Wirt persistieren. In der Fluchtphase entkommen diese hochselektierten nicht immunogenen Krebszellen dem Immunsystem und führen in Folge zu einer klinisch detektierbaren Krebserkrankung (2, 7, 85).

Die Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um dem Immunsystem zu schaden: Herunterregulierung/Mutation von Antigen-präsentierenden Mechanismen, um der Erkennung und Lyse durch zytotoxische Zellen zu entgehen, Expression inhibitorischer Checkpoint-Liganden und somit Hemmung der T-Zell-Reaktion, das Formen einer speziellen Tumormikroumgebung und die Rekrutierung von immunsuppressiven oder zytotoxischen Zellen (2, 102).

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem HNSCC um eine immunsuppressive Erkrankung handelt, die mit einer Beeinträchtigung der tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten und einer veränderten Funktion der natürlichen Killerzellen einhergeht (26, 54).

#### 2.2.4 Bedeutung von inhibitorischen Checkpoints (PD-1, PD-L1, PD-L2)

Nachdem schon in den 1980er Jahren die T-Zell-Reaktion auf Tumorzellen nachgewiesen wurde, entdeckte man in den frühen 2000ern zwei Liganden des PD-1-Signalweges und die Forschung auf diesem Gebiet wurde intensiviert.

Der inhibitorische Programmed Cell Death Protein 1-Rezeptor (PD-1-Rezeptor) wurde 1992 erstmals beschrieben (103). Zu Beginn wurde dieser Signalweg aufgrund seiner Fähigkeit die Apoptose von T-Zellen zu induzieren identifiziert, was ihn dazu befähigte die Immuntoleranz des Körpers zu unterstützen (104). PD-1 ist ein Transmembranglykoproteinrezeptor, der den intrazellulären Signalweg des T-Zell-Rezeptors (TCR) hemmt und somit eine koinhibitorische Funktion innehat. In ruhenden Zellen wird er schwach exprimiert, seine Expression wird jedoch bei Aktivierung der jeweiligen Immunzellen induziert (12, 46). PD-1 wird auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen (CD4+, CD8+), NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten/ Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (2, 46, 55). Die PD-1-Expression auf T-Zellen wird durch die Stimulierung des T-Zell-Rezeptors aufgrund der Bindung eines Antigenes gesteuert, die daraufhin eine komplexe Kaskade genetischer und epigenetischer Programme in Gang setzt. Bei Abwesenheit des Antigen-Stimulus wird PD-1 in der Regel wieder herunterreguliert, außer es liegt eine dauerhafte Aktivierung durch eine chronische Virusinfektion oder eine Krebserkrankung vor. Die PD-1-Expression ist somit Ausdruck einer Immunadaptation an eine chronische Stimulation und führt zur Einschränkung der Immunreaktion, was physiologisch als negativer Regulator zur Begrenzung von Autoimmunphänomenen genutzt wird (12, 13, 105). Von Tumorzellen wird dieser Mechanismus genutzt, um Toleranz zu erwirken. Die PD-1-Expression ist also initial ein Marker für die T-Zell-Aktivierung, später zeigt die hohe PD-1-Expression und ihr Zusammenwirken mit den Liganden aber auch eine Erschöpfung der T-Zellen und eine dadurch bedingte starke Hemmung der Immunantwort an (75).

Der zugehörige Programmed Cell Death Ligand 1 ist ein Oberflächenprotein, das vor allem in der Tumorzellmembran verankert wird, aber auch bei Lymphozyten oder anderen Immunzellen vorkommt. Die PD-L1-Expression wird durch die Stimulation von pro-inflammatorischen Zytokinen (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) bestimmt. Durch das Zusammenwirken von PD-1 einer aktiven T-Zelle mit seinem zugehörigen Liganden PD-L1 kommt es zur T-Zell-Dysfunktion und -Apoptose (87, 105-107). Krebszellen können somit durch die Expression von Oberflächenliganden, die an Checkpoint-Rezeptoren von T-



lassen, da durch die spezifische Blockade von PD-1 die Wirkung beider möglicher Liganden verhindert wird und die PD-L2 vermittelte Immunsuppression ebenso geschwächt wird (9).

PD-L1 wird in der Literatur sowohl als negativer, als auch als positiver Faktor für die Gesamtprognose (unabhängig von der Therapie) diskutiert. Ebenso scheint die PD-L1-Expression auch abhängig von der Tumor-Lokalisation zu sein (4).

Diskutiert werden auch Zusammenhänge zwischen der Prävalenz von PD-L1 und Faktoren wie Alter, Geschlecht, Tumor-Differenzierungsgrad, LK-Status und auch der Exposition von Risikofaktoren (4, 33, 90, 91, 112).

Auch wenn ein Tumor durch die Expression von PD-L1 grundsätzlich als aggressiver gilt, da er der körpereigenen Anti-Tumor-Immunreaktion entkommen kann, kann eine vermehrte Expression des PD-L1-Proteins aber auch zu einem verbesserten Ansprechen auf spezifische Immuntherapien und somit einem insgesamt verbesserten Gesamtüberleben führen (1, 4). Hierbei scheint aber nur die generelle Expression von PD-L1 von Bedeutung zu sein, da keine signifikanten Unterschiede zwischen niedriger PD-L1-Expression (1-49%) und hoher Expression (>50%) nachgewiesen werden konnten, jedoch ein deutlich verbessertes Gesamtüberleben dieser Population verglichen zu <1% PD-L1-Positivität. Eine über 50-prozentige PD-L1-Expression gilt jedoch ohne Immuntherapie als unabhängiger prognostischer Faktor für ein schlechteres Überleben (90). Viele klinische Studien haben mittlerweile gezeigt, dass Antikörper, die PD-1 und PD-L1 blockieren, eine zuverlässige Wirkung auf viele fortgeschrittene Malignome haben. Somit stellt die PD-L1-Expression von HNSCC einen möglichen Biomarker zur Vorhersage der Tumorbiologie, eines möglichen Therapieansprechens auf eine Anti-PD-1/PD-L1-Immuntherapie und somit ein besseres OS dar (1, 64). Dies gilt jedoch nicht für alle soliden Tumore (Mammakarzinom, Nierenzellkarzinom, Urothelkarzinom, Magenkarzinom), bei denen der Trend eher zeigt, dass eine PD-L1-Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht (113).

Der Anteil von PD-L1-positiven HNSCC weist in den vorliegenden Studien eine große Heterogenität auf und liegt bei 60-80% (1, 71, 90, 107, 114). Leider sprechen aber nicht alle PD-L1-exprimierende Tumore auf eine Therapie mit PD-1/PD-L1-Checkpoint-Inhibitoren an und auch PD-L1-negative Tumore können ebenso gelegentlich positiv auf eine Checkpoint-Blockade reagieren (55, 67). Dies könnte darauf

zurückzuführen sein, dass PD-L1 ein induzierbares Molekül ist, dessen Expression dynamisch ist und eine starke intratumorale Heterogenität aufweist (48).

Ebenso muss bedacht werden, dass es auch andere inhibitorische, immunsupprimierende Signalwege gibt, die durch die Blockade von PD-1/PD-L1 unbeeinflusst bleiben und somit trotzdem zu einer Abschwächung der Anti-Tumor-Reaktion führen können. Diese könnten gegebenenfalls durch eine Kombinationstherapie mit anderen Immuntherapeutika gleichzeitig blockiert werden, um die T-Zell-Funktion noch weiter zu verbessern (89).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Patientenkollektiv

Die Auswahl der Patienten erfolgte initial mittels ICD-Codes des Diagnoseklassifikationssystems ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems). Es wurde nach Patienten gesucht, die sich im Zeitraum zwischen dem 01.01.2010 und dem 31.12.2015 in der HNO-Klinik der Universitätsmedizin Mainz vorstellten und von denen histologische Befunde vorlagen. Hierfür wurde das Programm PathoPro verwendet, in dem sich alle pathologisch-anatomischen Befundberichte der Patienten der Universitätsmedizin Mainz befinden. Gesucht wurde nach histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Halsbereiches, dies entspricht den ICD-Codes C01-C05, sowie C09-C13 (siehe Tabelle 5: ICD-Codes) des Kapitels 2 (Neubildungen). Es wurden Patienten eingeschlossen, von denen ausreichend histologisches Material des Tumors vorlag. Es wurden sowohl Patienten aufgenommen, bei denen in den oben genannten Jahrgängen ein Primärtumor diagnostiziert wurde, als auch Patienten mit Rezidivtumoren. Die entweder nativen oder in Formalin fixierten Präparate wurden beim Eintreffen im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz nach den dort herrschenden Standards für den Schnellschnitt oder den Zuschnitt haltbar gemacht, sodass daraus die haltbaren archivierten Paraffinblöcke entstanden sind.

Dem Programm PathoPro wurden ebenfalls andere relevante histopathologische Daten (wie zum Beispiel das TNM-Stadium) entnommen.

Insgesamt fanden sich hierbei ca. 400 mögliche Patienten. Von diesen konnten 324 Patienten eingeschlossen und lichtmikroskopisch begutachtet werden, deren Gewebeschnitte und Paraffinblöcke im Institut der Pathologie zur Verfügung standen. Die verfügbaren HE-gefärbten Gewebe-/Tumorschnitte wurden dann lichtmikroskopisch begutachtet, beurteilt und die in Frage kommenden Schnitte zur Anfertigung eines Tissue-Microarray vorbereitet. Hierbei wurden nur Tumorschnitte verwendet, bei denen ausreichend Tumorgewebe vorhanden war. Zur Herstellung des TMA wurde ein Bereich des Gewebeschnittes ausgewählt und auf dem Objektträger markiert, in dem sich möglichst viel vitales Tumorgewebe befand. Anschließend wurde der zugehörige Paraffinblock zur TMA-Herstellung verwendet.

Tabelle 5: ICD-Codes (115)

ICD-10 Code	Bedeutung
C01	Bösartige Neubildung des Zungengrundes
C02	Bösartige Neubildung sonstiger und nicht näher bezeichneter Teile der Zunge (z.B. Zungenrücken /-rand /-unterfläche /-tonsille)
C03	Bösartige Neubildung des Zahnfleisches
C04	Bösartige Neubildung des Mundbodens
C05	Bösartige Neubildung des Gaumens (harter/weicher Gaumen, Uvula)
C09	Bösartige Neubildung der Tonsille
C10	Bösartige Neubildung des Oropharynx
C11	Bösartige Neubildung des Nasopharynx
C12	Bösartige Neubildung des Recessus piriformis
C13	Bösartige Neubildung des Hypopharynx

### 3.2 TMA-Herstellung

Allgemein bietet die Tissue-Microarray-Technik eine effiziente Möglichkeit zur Detektion von Zielstrukturen mittels Immunhistochemie. Die TMA-Herstellung ermöglicht das Einbringen von multiplen Gewebezyllindern mit einem definierten Durchmesser in einen einzigen Paraffinblock. Die hergestellten TMAs ermöglichen im Hochdurchsatzverfahren die Erfassung von Zielstrukturen vieler Tumorentitäten und/oder Patientenproben gleichzeitig auf einem Objektträger. Somit entfällt die Färbung einzelner Tumorschnitte und es werden in einem Verfahren gleichzeitig mehrere Gewebeproben verschiedenster Patienten gefärbt, sodass die Expression eines Proteins in unterschiedlichen Tumoren gesammelt begutachtet werden kann. Hierbei werden auf einem Objektträger verschiedene Cores definiert, die jeweils die Gewebeprobe eines Patienten enthalten (116).

Zur Herstellung eines TMA wurde der *TMArrayer* verwendet. Es wurden mit einer Hohl-nadel (Recipient Punch) und einer Haltevorrichtung für die Paraffinblöcke aus dem primär gewebefreien Empfängerblock Zylinder mit einem Durchmesser von einem Millimeter ausgestanzt, an deren Stelle mit der zweiten Hohl-nadel (Donor Punch) entnommene Gewebezyllinder aus dem Tumorblock des Patienten eingesetzt wurden.

Hierzu wurde der auf den HE-Schnitten umrandete Bereich mit Tumorgewebe aufgesucht und benutzt (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29 im Anhang).

Außerdem wurde parallel das TMA-Schema zur späteren Identifikation und Zuordnung der Cores erstellt. Als Orientierungspunkt dienten in der linken oberen Ecke zwei vertikal aufgebrauchte Muskelpräparate.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Paraffinblöcke erstellt: der erste Block enthielt die Tumor-Stanzzyylinder der Patienten der Jahrgänge 2010-2013 (insgesamt 85, von denen 78 Cores Tumorgewebe enthielten und analysiert werden konnten), der zweite Block diejenigen der Jahrgänge 2014-2015 (insgesamt 65 Cores, von denen 62 Tumorgewebe enthielten). Zur Herstellung der zur immunhistochemischen Färbung benötigten TMA-Schnitte wurden die zwei Paraffinblöcke der TMAs dann am Rotationsmikrotom drei Mikrometer dick geschnitten und über ein Wasserbad auf Objektträger gebracht und im Anschluss auf der Wärmeplatte angetrocknet und gestreckt (siehe Abbildung 30 im Anhang). Danach wurden sie bei 37 °C im Wärmeschrank über Nacht vollständig getrocknet. Schlussendlich konnten die TMA-Schnitte dann jeweils auf die acht unten genannten Marker immunhistochemisch gefärbt werden. Dadurch ergaben sich insgesamt 140 auswertbare TMA-Cores.

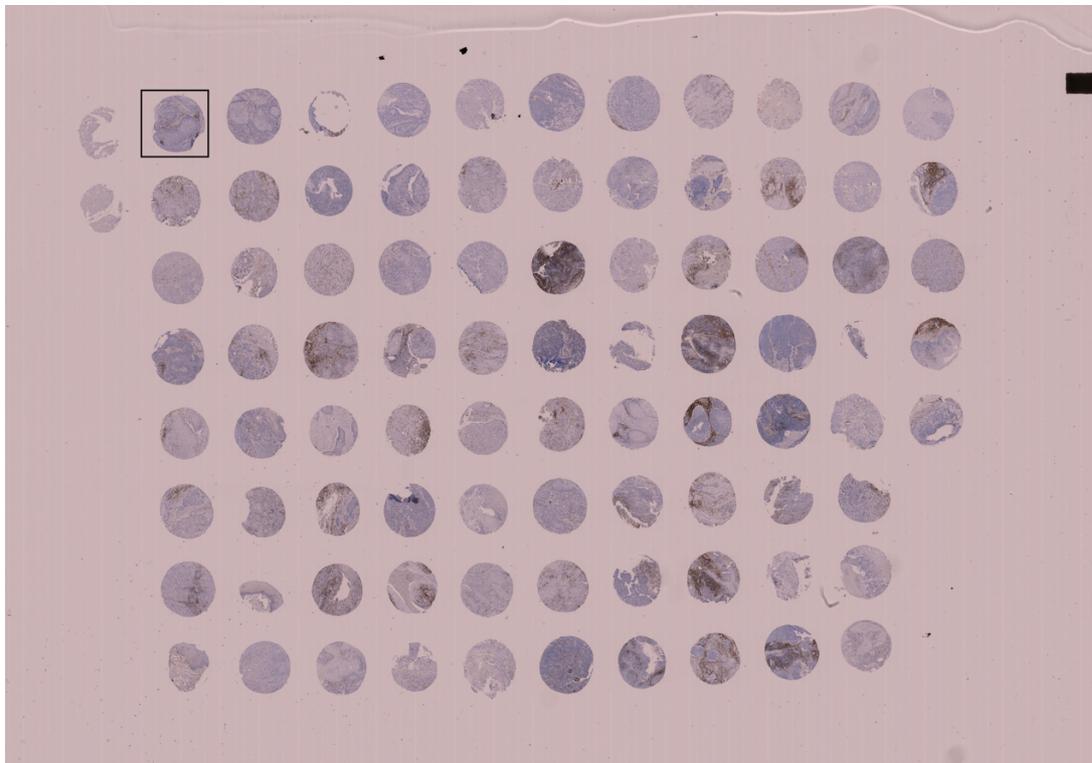


Abbildung 5: TMA 1 (Patientenkollektiv 2010-2013 mit immunhistochemischer CD3-Färbung)

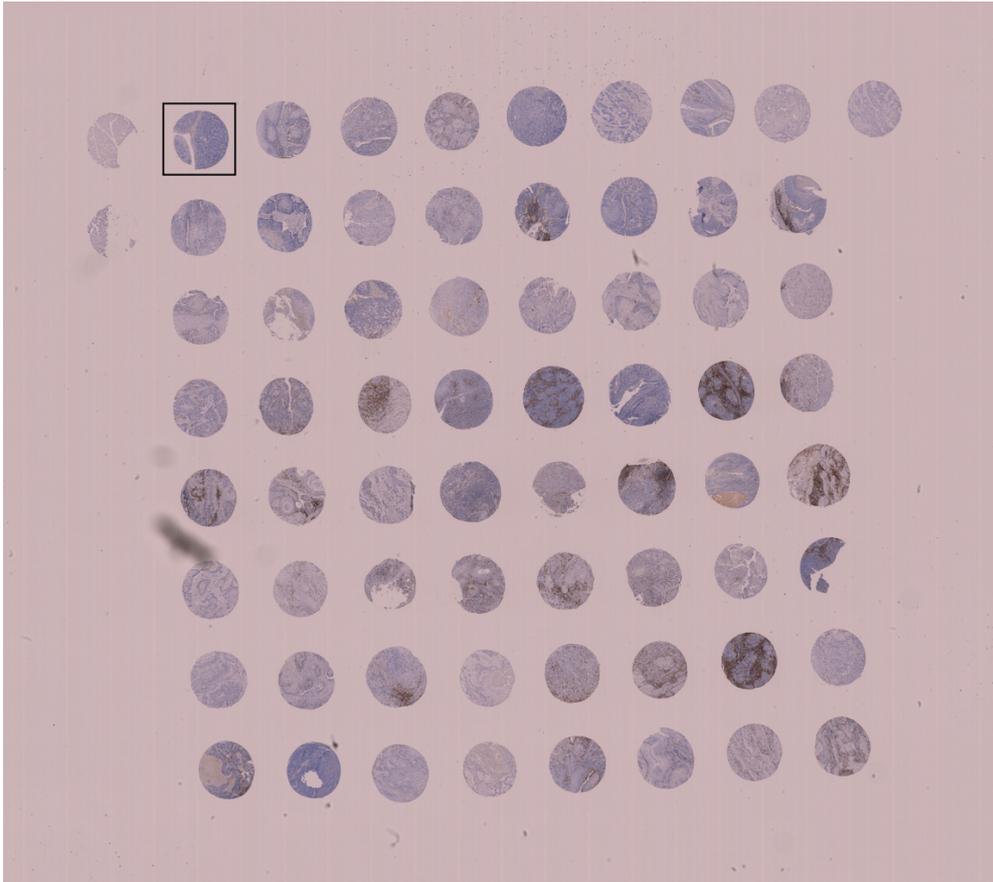


Abbildung 6: TMA 2 (Patientenkollektiv 2014-2015 mit immunhistochemischer CD3-Färbung)

### 3.3 Immunhistochemie

Allgemein dienen immunhistochemische Untersuchungen dem Nachweis und der Lokalisation bestimmter Zellstrukturen (Proteine) anhand der Wechselwirkung dieser Antigene mit zugeführten Antikörpern. Man unterscheidet hier zwischen indirekten und direkten Nachweismethoden. Zuerst erfolgt die Bindung eines Primärantikörpers (mono- oder polyklonal) an ein bestimmtes Zell-/ Gewebeanantigen. Bei der direkten Methode sind diese Primärantikörper bereits mit einem Enzym/Farbstoff markiert, beim indirekten Nachweis muss in einem zweiten Schritt ein zweiter, markierter Antikörper an den Antigen-Antikörperkomplex der Primärreaktion gebunden werden. Zum Sichtbarmachen der gebundenen Antikörper muss hier abschließend dann noch ein Markermolekül (Fluoreszenzfarbstoff, Enzym, kolloidales Gold) daran gekoppelt werden (117). Immunhistochemische Detektionsmethoden werden heutzutage sehr häufig im Rahmen der Tumordiagnostik verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer indirekten Nachweismethode und somit mit Primär- und Sekundärantikörpern, sowie weiteren Reagenzien zum Sichtbarmachen gearbeitet (siehe Abbildung 31, Abbildung 32, Abbildung 33, Abbildung 34, Abbildung 35 im Anhang). Ein genaues Versuchsprotokoll einer solchen immunhistochemischen Färbung am Beispiel von PD-L1 findet sich im Anhang.

Die immunhistochemisch gefärbten TMA-Schnitte wurden dann mit dem *Hamamatsu NanoZoomer 2.0-HAT-Scanner* eingescannt, als NDPI-Datei digitalisiert und konnten dann mithilfe der unten genannten Programme ausgewertet werden.

Zur Bewertung der PD-L1-Expression existieren mehrere Scoring-Systeme, die bei verschiedenen Tumorentitäten Verwendung finden. Hierbei wird jeweils der relative/prozentuale Anteil gefärbter Zielzellen bezogen auf eine Zellpopulation bestimmt. Die gängigen Scoring Systeme unterscheiden sich folgendermaßen: während beim *tumor proportion score* (TPS) nur die (PD-L1-)gefärbten Tumorzellen in Relation zur Gesamtheit der Tumorzellen betrachtet werden, bezieht der *combined positive score* (CPS) außer den gefärbten Tumorzellen noch PD-L1-positive mononukleäre Immunzellen (Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) mit ein und setzt diese in Relation zu allen Tumorzellen (118). In Anlehnung an den CPS verwendeten wir in unserer Studie einen kombinierten Tumor-Stroma-Score (KTSS), der aufgrund der Einschränkungen der digitalen Bildanalyse bei der Zelltypunterscheidung am nächsten an den gängigen CPS herankam. Der KTSS unterscheidet nicht zwischen den Zelltypen des Stromagewebes und bezieht somit (außer den Tumorzellen und den mononukleären Immunzellen) auch möglicherweise andere PD-L1-positive Zellen mit ein.

#### 3.4 TNM-Klassifikation

Die Einteilung der Tumore nach ihrer Größe und Ausdehnung erfolgte anhand der TNM-Klassifikation der Kopf-Hals-Tumore. Hierbei wurde überwiegend die TNM-Klassifikation der 7. Auflage (2010) verwendet (84). Die Einschätzung erfahrener Pathologen aus den pathologischen Beurteilungen wurde übernommen und in Einzelfällen durch klinische Einschätzungen der behandelnden HNO-Ärzte ergänzt.

### 3.5 Laborgeräte, Mikroskope

Tabelle 6: Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Leica Eindeckautomat CV 5030	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DMLB Model U- MDO10B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Dampfgarer Multi-Gourmet	Firma Braun GmbH, Kronberg im Taunus, Deutschland
Objektträgerstrecktisch/Wärmeplatte Medite OTS 40	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Rotationsmikrotom Hyrax M55	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland
Färbeautomat DAKO Autostainer <sup>plus</sup>	Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA
Scanner für Objektträger Nano Zoomer 2.0 HT	HAMAMATSU PHOTONICS K. K., Sys- tems Division, 812 Joko-cho, Higashi-ku, Hamamatsu City, 431-3196, Japan
Wärme-/Trockenschrank Heraeus Func- tion Line UT6	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
TMArrayer	Pathology Devices Inc., Westminster, USA

### 3.6 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Tabelle 7: Chemikalien/Reagenzien

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Paraffin	Klinika Medical GmbH, Usingen, Deutschland
Xylol (reinst)	SAV Liquid Production GmbH, Flints- bach am Inn, Deutschland
Ethanol 99%	SAV Liquid Production GmbH, Flints- bach am Inn, Deutschland

Ethanol 96%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
Ethanol 70%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
Aqua dest.	Hausleitung
EnVision™ FLEX KIT, High pH	Agilent DAKO Technologies, Santa Clara CA, USA
EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH	Agilent DAKO Technologies, Santa Clara CA, USA
EnVision™ FLEX Antibody Diluent	Agilent DAKO Technologies, Santa Clara CA, USA
EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER)	Agilent DAKO Technologies, Santa Clara CA, USA
Hämatoxylin Mayer's	Agilent DAKO Technologies, Santa Clara CA, USA
Entellan	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 8: Arbeits- und Verbrauchsmaterial

<b>Arbeits-/Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Super Frost Plus Objektträger	Fisher Scientific
Deckgläser 24 x 50 (Cover Slips)	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, Deutschland
Mikrotomklingen	PFM Medical AG, Köln, Deutschland
Färbestation	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Objektträgerhalterung für Färbestation	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland

Tabelle 9: Primär-Antikörper für immunhistochemische Färbung

Antikörper	Wirt	Klon	Hersteller	Verdünnung
CD3	Kaninchen	Polyklonal	Dako FLEX, Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA	Ready to use
CD4 (Clone 4B12)	Maus	Monoklonal	Dako FLEX, Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA	Ready to use
CD8 (Clone C8/144B)	Maus	Monoklonal	Dako FLEX, Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA	Ready to use
CD56 (Clone 123C3)	Maus	Monoklonal	Dako FLEX, Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA	Ready to use
CD68 (Clone PG-M1)	Maus	Monoklonal	Dako FLEX, Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA	Ready to use
Anti-PD-L1	Kaninchen	Monoklonal	abcam, Cambridge, UK	1:250
Anti-PD-L2	Kaninchen	Polyklonal	abcam, Cambridge, UK	1:20
PD1	Maus	Monoklonal	abcam, Cambridge, UK	1:100

### 3.7 Analysesoftware und Datenbanken

#### 3.7.1 HALO und QuPath

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Tissue-Microarrays erfolgte zuerst mit dem Programm *HALO* am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz. Hierbei zeigten sich im Verlauf erhebliche Probleme bei der Bildanalyse, die in einer unzureichenden Funktion des Programms endeten. Aufgrund dessen wurde dann auf das Programm *QuPath* zur Bildauswertung der TMAs umgestiegen. Hierbei wurde zuerst automatisiert die Zellzahl des jeweiligen Cores analysiert, sowie differenziert, ob es sich um immunhistochemisch angefärbte (bräunliche) oder negative (violett/blau) Zellen handelt (siehe Abbildung 36 im Anhang). Im nächsten Schritt wurde dann zwischen Tumorgewebe, umliegendem Stroma und weiteren Gewebearten (z.B.

Muskelgewebe) unterschieden. Abschließend erfolgte die Gesamtauswertung der positiven/negativen Zellen im Bezug zum Tumorgewebe, dem Stroma oder anderem definiertem Gewebe (siehe Abbildung 37, Abbildung 38, Abbildung 39 im Anhang). Es wurden die immunhistochemischen Marker CD3, CD4, CD8, CD56, CD68, PD-L1, PD-1, PD-L2 von allen 140 Patienten ausgewertet. Die hieraus entstandene Tabelle wurde in die erstellte Excel-Tabelle bei den jeweiligen Patienten integriert.

### 3.7.2 TUBA

Die restlichen (v.a. klinischen) Daten der Patienten wurden der Datenbank *TUBA* entnommen. Diese Datenbank wurde mithilfe der Patientenakten aus der HNO-Klinik der Universitätsmedizin Mainz erstellt und kontinuierlich aktualisiert. Folgende klinische Daten wurde hier entnommen: Alter bei Diagnosestellung, Nikotinkonsum, Alkoholkonsum, Therapiemethode, Überlebenszeit, sowie teilweise das klinische cTNM-Stadium (dieses wurde allerdings nur verwendet, wenn keine pathologische TNM-Klassifikation erfolgt war – pTNM).

Zur Analyse der Überlebenszeit wurde das Datum der Entnahme des vorliegenden Tumorschnittes als Startpunkt des Beobachtungszeitraumes gewertet.

Nach Vervollständigung der Excel-Tabelle wurde diese in das Statistikprogramm *SPSS* eingespeist, welches eine spezifische Auswertung der Daten ermöglichte.

## 3.8 Statistik

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mittels des Statistikprogrammes „SPSS Statistics Version 23®“ (IBM, Armonk - New York, USA), nachdem die gesammelten Daten aus einer Excel-Tabelle übertragen wurden. Hierfür konnten insgesamt die Daten von 137 Patienten verwendet werden.

### 3.8.1 Deskriptive Statistik

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden die Daten zunächst durch Erstellung von Tabellen und Abbildungen veranschaulicht und deren Lage, Streuung und Verteilung beschrieben. Es folgten explorative Datenanalysen, bei denen der Mittelwert und der Median, sowie die Standardabweichung zur Beschreibung metrischer Daten diente. Als Maß für die Streuung wurden die Standardabweichung und der Interquartilbereich ermittelt. Zur Beschreibung nominaler und ordinaler Daten diente die Bestimmung der

absoluten und relativen Häufigkeiten der jeweiligen Kategorien mithilfe von Häufigkeitstabellen.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Boxplots, Kuchendiagrammen, Histogrammen, sowie Balken- und Streudiagrammen.

### 3.8.2 Schließende Statistik

Basierend auf den Ergebnissen der deskriptiven Statistik konnten statistische Tests durchgeführt werden, die Zusammenhänge hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz prüfen. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt. Zunächst wurden alle metrisch skalierten Werte graphisch mit Histogrammen und analytisch mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft.

Es zeigte sich nur für das Patientenalter eine Normalverteilung und annähernd für die CD68-Expression. Beim weiteren Vorgehen wurden dementsprechend nicht-parametrische Tests verwendet, die keine Normalverteilung der Daten voraussetzen.

Zur Überprüfung der Signifikanz der überwiegend nicht-normalverteilten Daten wurden der Mann-Whitney-U-Test für zwei Gruppen und der Kruskal-Wallis-Test für mehr als zwei Gruppen durchgeführt.

Um den Einfluss der unabhängigen stetigen Variablen (CD3, CD4, CD8, CD56, CD68, PD1 und PD-L2) auf die PD-L1-Expression zu untersuchen wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Vorher wurde zum Ausschluss von Multikollinearität mithilfe der Spearman-Korrelation ermittelt, inwieweit es innerhalb der unabhängigen Variablen Korrelationen gibt. Hierbei zeigte sich keine für die folgende Analyse kritische Interaktion, alle Korrelationskoeffizienten waren  $|r| < 0,75$ . Somit konnten alle Variablen in die Regressionsanalyse aufgenommen werden.

Auf eine Cox-Regression wurde aufgrund der wenigen Ereignisse (Tod) verzichtet.

Die Überlebensanalyse wurde mit der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt, die die Unterschiede des Gesamtüberlebens verschiedener Patientengruppen beschreibt. Der Log-Rank-Test wurde hierbei eingesetzt, um die resultierenden Überlebenskurven auf einen statistisch signifikanten Unterschied zu überprüfen.

Tabelle 10: Programme

<b>Programm</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller</b>
PathoPro	Version 9.0.9070	ifms GmbH (Institut für medizinische Software), Saarbrücken, Deutschland
HALO Image Analysis Software	HALO v2.1.1634 September 2017	Indica Labs Inc., Corrales New Mexico
QuPath	Version 0.2.0	The Queen's University of Belfast, Northern Ireland The University of Edinburgh
Microsoft Excel für Mac	Version 16.38	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Microsoft Word für Mac	Version 16.38	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Endnote X9	Version X9.3.3	Clarivate Analytics, Boston
TUBA		Programmiert von Maximilian Deichelbohrer für die HNO-Klinik und das Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz
SPSS	Version 27.0.1.0	IBM Corporation

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse des Patientenkollektivs

Im Rahmen unserer retrospektiven Analyse konnten insgesamt 137 Patienten in die Auswertung eingeschlossen werden, deren Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome im Zeitraum von Januar 2010 bis Dezember 2015 histologisch am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz untersucht wurden. Hierbei handelte es sich um 119 Primärtumore, 14 Rezidivtumore und 4 Zweittumore.

Der Beobachtungszeitraum reichte vom Tag der Diagnose bis maximal Oktober 2020. Im Durchschnitt wurden die Patienten 28,7 Monate lang beobachtet. Bei einigen Patienten lag nur ein einziger Datensatz der initialen Probenentnahme vor, da die Patienten danach beispielsweise in anderen Krankenhäusern weiterbehandelt wurden. Somit lag die minimale Beobachtungszeit bei 0 Tagen, die maximale Beobachtungszeit betrug 8,75 Jahre. Am Ende der Beobachtungszeit waren noch 67,9% (93 Patienten) am Leben. Die restlichen 44 Patienten sind verstorben und überlebten im Durchschnitt ca. 20,3 Monate bis zum Todeseintritt. Hierbei zeigte sich jedoch eine große Spannweite von minimal zweieinhalb Wochen bis maximal fünf Jahren.

Zum Zeitpunkt des letzten Kontaktes waren 47,4% der Patienten tumorfrei, bei 24,1% war noch Tumorgewebe vorhanden, von 39 Patienten (28,5%) lagen diesbezüglich keine Informationen vor.

#### 4.1.1 Geschlechts- und Altersverteilung

Das Tumorkollektiv setzte sich aus 107 Männern (78,1%) und 30 Frauen (21,9%) zusammen. Das Lebensalter der Patienten bei Diagnosestellung zeigte sich sowohl graphisch (Histogramm) als auch mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests normalverteilt und betrug zum Zeitpunkt der Diagnosestellung durchschnittlich 63,7 Jahre, wobei der jüngste Patient 31 Jahre und der älteste Patient 84 Jahre alt war. Frauen waren im Mittel bei Diagnose 3,55 Jahre jünger als Männer (60,93 vs. 64,48 Jahre).

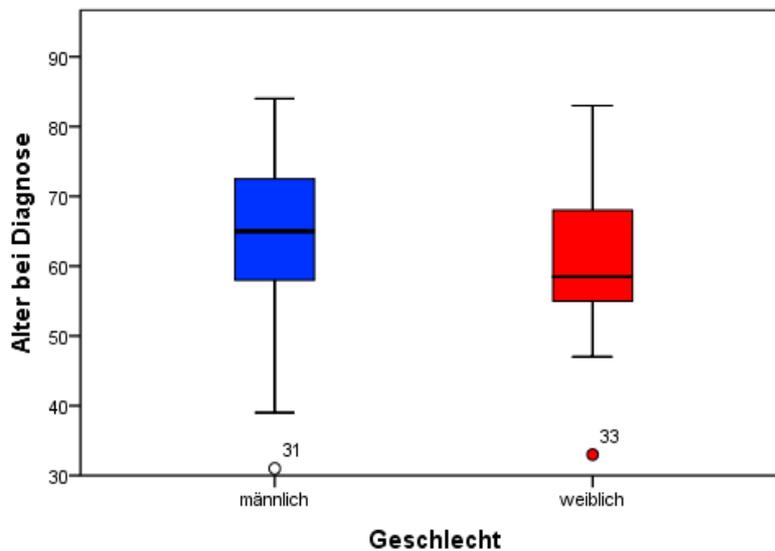


Abbildung 7: Boxplot - Alter bei Diagnose aufgeteilt nach Geschlecht

Es konnte ein signifikanter Unterschied mit jedoch nur schwacher Effektstärke ( $r=0,169$ ) der PD-L1 Expression des untersuchten Gesamtgewebes (Stroma- + Tumorgewebe) bei Männern und Frauen festgestellt werden ( $p=0,049$ ; Mann-Whitney-U-Test). Die PD-L1 Expression bei Männern ist somit signifikant höher als bei Frauen. Betrachtet man nur die PD-L1-Expression des Tumorgewebes, kann man von keinem signifikanten Unterschied mehr sprechen ( $p=0,068$ ).

Nach Spearman-Rho zeigte sich keine Korrelation zwischen der Höhe der PD-L1-Expression und dem Alter des Patienten ( $p=0,174$ ).

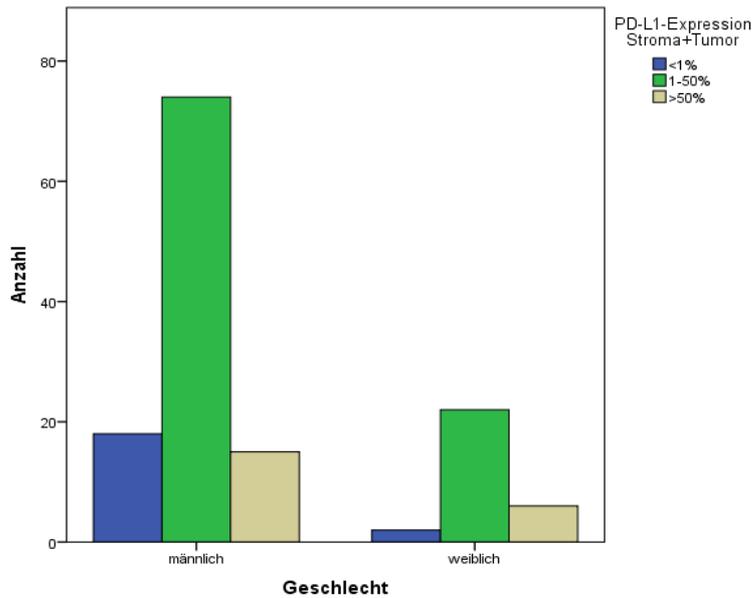


Abbildung 8: PD-L1-Expression in Abhängigkeit des Geschlechts

#### 4.1.2 Tumorlokalisation

Die alle im Kopf-Hals-Bereich gelegenen Plattenepithelkarzinome befanden sich am häufigsten am Zungenkörper (n=32), gefolgt vom Zungengrund (n=28), dem Mundboden und den Tonsillen (jeweils n=21) und dem Hypopharynx (n=18). Weitere Lokalisationen waren der Oropharynx (n=11) und der Gaumen (n=3). Je ein Patient war von einem Karzinom der Lippe, des Nasopharynx und des Zahnfleisches betroffen.

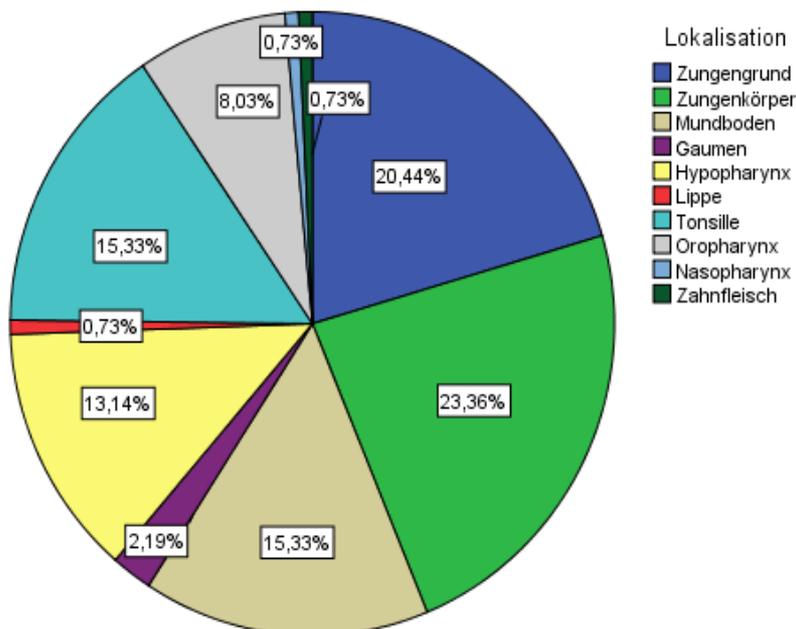


Abbildung 9: Lokalisationen der untersuchten Plattenepithelkarzinome

#### 4.1.3 Tumorklassifikation

Die Patienten wurden anhand der TNM-Klassifikation eingeteilt. Am häufigsten wiesen die Patienten Tumore im T2-Stadium auf (30,7%), darauf folgten zu gleichen Teilen T1- und T3-Tumore (24,1%) und weniger T4a-Tumore (14,6%). Nur zwei Patienten befanden sich im T4b-Stadium (1,5%), bei sieben Patienten (5,1%) konnte das T-Stadium nicht ermittelt werden.

Zum Zeitpunkt des Stagings wiesen die meisten Patienten keine Lymphknotenmetastasen auf (N0-Stadium - 28,5%). Am zweithäufigsten lag ein N2b-Stadium vor (24,1%), es folgten 11,7% im N2c-Stadium, 8,8% im N1-Stadium, 4,4% im N2a-Stadium und 1,5% im N3-Stadium. Bei 21,2% konnte kein Lymphknotenstatus erhoben werden (NX-Stadium).

Fernmetastasen lagen nur bei 5,1% der Patienten vor, 71,5% wiesen keine Fernmetastasierung auf. Bei den restlichen Patienten (23,4%) blieb das M-Stadium unbekannt.

Der Differenzierungsgrad der Plattenepithelkarzinome (Grading) teilte sich wie folgt auf: 3,6% gut differenzierte (G1-) Tumore, 60,6% mäßig differenzierte (G2-) Tumore, 35% schlecht differenzierte (G3-) Tumore und nur ein Patient mit einem G4-entdifferenzierten Tumor (entsprechend 0,7%).

Tabelle 11: Häufigkeitstabelle: TNM-Stadium, Grading, Lymphgefäß-/ Venen- und perineurale Infiltration

	Häufigkeit	Prozentualer Anteil
<b>T-Stadium</b>		
T1	33	24,1
T2	42	30,7
T3	33	24,1
T4a	20	14,6
T4b	2	1,5
TX (unbekannt)	7	5,1
<b>N-Stadium</b>		
N0	39	28,5
N1	12	8,8

N2a	6	4,4
N2b	33	24,1
N2c	16	11,7
N3	2	1,5
NX (unbekannt)	29	21,2
<b>M-Stadium</b>		
M0	98	71,5
M1	7	5,1
MX (unbekannt)	32	23,4
<b>Grading</b>		
G1 - gut differenziert	5	3,6
G2 – mäßig differenziert	83	60,6
G3 – schlecht differenziert	48	35
G4 – undifferenziert	1	0,7
<b>Lymphgefäßinvasion</b>		
Nein	3	2,2
Ja	18	13,1
unbekannt	116	84,7
<b>Veneninvasion</b>		
Nein	4	2,9
Ja	6	4,4
unbekannt	127	92,7
<b>Perineurale Invasion</b>		
Nein	2	1,5
Ja	5	3,6
Unbekannt	130	94,9

Durch die Ermittlung der TNM-Klassifikation ergab sich auch das UICC-Stadium, was einen besseren Vergleich der einzelnen Schweregrade erlaubt. Hierbei zeigte sich folgende Verteilung:

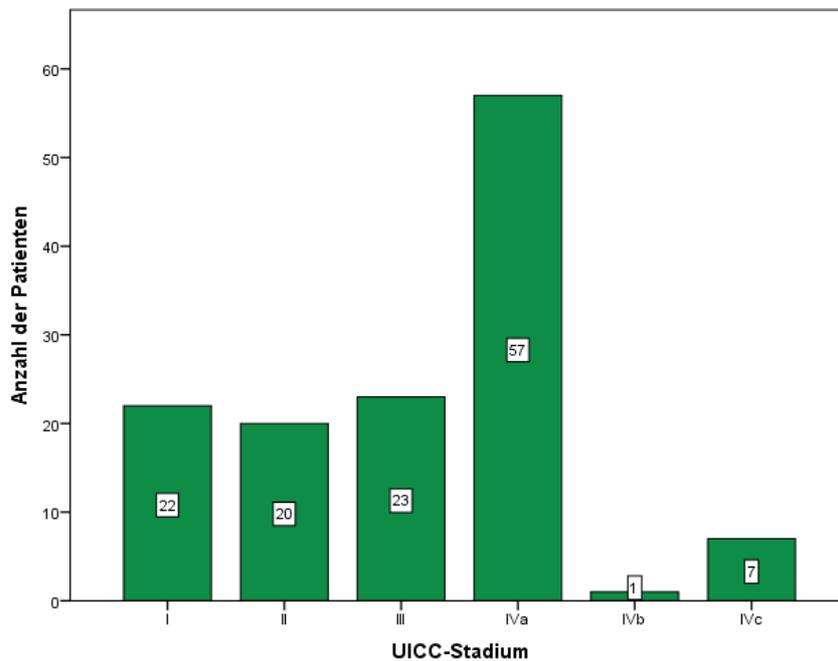


Abbildung 10: Verteilung der UICC-Stadien

Es konnten mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der PD-L1-Expression und der Lokalisation des Tumors ( $p=0,194$ ), dem T-Stadium ( $p=0,09$ ), dem Lymphknotenstatus ( $p=0,097$ ), der Fernmetastasierung ( $p=0,248$ ), dem UICC-Stadium ( $p=0,403$ ) oder dem Differenzierungsgrad ( $p=0,311$ ) dargestellt werden.

#### 4.1.4 Therapie

Die Therapie der neu diagnostizierten Plattenepithelkarzinome unseres Kollektivs erfolgte nach ausführlicher Diskussion im Rahmen eines interdisziplinären Tumorboardes. In den meisten Fällen wurde nach Diagnosesicherung eine primär operative Therapie gewählt (73,1%). Bei ca. der Hälfte der operierten Patienten (48 von insgesamt 100) erfolgte im Anschluss eine adjuvante Therapie. Diese bestand entweder aus einer alleinigen Bestrahlung, einer Radiochemo-Therapie oder einer Kombination aus einer Bestrahlung und einer zielgerichteten Therapie mit Cetuximab. Verwendete Chemotherapeutika waren Cisplatin und 5-Fluoruracil. Bei einigen wenigen Patienten erfolgte auch eine primäre Radio- bzw. Radiochemo-Therapie oder kombinierte

Radiatio mit zielgerichteter Cetuximab-Therapie. Hierbei kamen noch Carboplatin als Ersatz für Cisplatin bei Unverträglichkeit und Docetaxel hinzu. Des Weiteren erfolgte bei 16 Patienten eine Induktionschemotherapie mit oben genannten Medikamenten in unterschiedlichen Kombinationen. In primär palliativer Intention wurden nur 6 Patienten behandelt; hiervon erhielten 2 Patienten eine palliative Chemo-/Immuntherapie, der Rest wurde mittels *best supportive care* behandelt. Nach der Primärtherapie des Karzinoms befand sich die Mehrheit (58,4%) der Patienten in Vollremission, 14,6% zeigten eine partielle Remission und der Rest zeigte entweder keine Veränderung, befand sich in Progress oder musste die Therapie abbrechen. Bei 18 Patienten blieb der Erfolg unklar.

Bei der Sekundär- bzw. Tertiärtherapie der Patienten ohne Vollremission wurde selten nachoperiert und deutlich häufiger eine Radio-, Radiochemo- oder Radiatio-Cetuximab-Therapie bzw. eine palliative Therapie gewählt. Erst im Rahmen der Tertiärtherapie kamen erstmals Checkpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab oder Nivolumab zum Einsatz. Eine Immuntherapie mit diesen Substanzen wurde insgesamt nur bei zwei Patienten des gesamten Kollektivs angewandt.

Eine Neck Dissection erfolgte entweder primär oder im Verlauf bei dem Großteil der Patienten (62,8%, davon 45,3% bilateral und 17,5% unilateral). Bei 46 Patienten (33,6%) wurde keine Neck Dissection durchgeführt. In fünf Fällen war nicht zu ermitteln, ob eine Neck Dissection durchgeführt wurde.

In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv lag bei 48,2% der Patienten eine R0-Situation mit histologisch tumorfreien Resektionsrändern vor. 10,9% der Patienten befanden sich in einer R1-Situation und hatten somit histologisch tumorbefallene Resektionsränder. Bei einem Patienten verblieb ein makroskopisch sichtbarer Tumorrest (R2-Situation). Bei dem Rest der Patienten (55 Patienten, 40,1%) wurde entweder keine operative Tumorsektion durchgeführt oder der R-Status war nicht beschrieben.

#### 4.1.5 Noxen

##### 4.1.5.1 Tabak

Lediglich 6 Patienten (4,4%) hatten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung niemals geraucht. Die Mehrzahl der Patienten (59,2%) waren aktive Raucher; hiervon rauchten 6,6% weniger als 20 packyears, 28,5% mehr als 20 py und bei 24,1% war die Menge unklar. Bei 50 Patienten (36,5%) war keine Angabe zum Rauchverhalten vorhanden.

Es ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Rauchverhalten und der PD-L1-Expression des Gewebes darstellen ( $p=0,084$ ; Kruskal-Wallis-Test).

#### 4.1.5.2 Alkohol

Nur 5,1% der Patienten gaben an nie Alkohol zu konsumieren. Bei 47,4% der Patienten lag ein Alkoholkonsum vor. Bei 47,4% der Patienten blieb die Angabe unbekannt. Es ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Trinkverhalten und der PD-L1-Expression darstellen ( $p=0,548$ ; Kruskal-Wallis-Test).

#### 4.1.6 Todesursache

Von den 44 verstorbenen Patienten ließ sich die Todesursache bei 9 Patienten auf das Tumorgeschehen zurückführen, bei 9 weiteren Patienten lag eine andere Todesursache vor. Hierbei handelte es sich beispielsweise um ein Multiorganversagen, eine respiratorische Insuffizienz bei Pneumonie, eine kardiopulmonale Dekompensation, ein Zweittumor oder eine Hirnblutung. Bei den restlichen 26 Patienten war die Todesursache unklar.

#### 4.1.7 PD-L1-Expression

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde zwischen der Expression des Tumorgewebes und des umgebenden Gewebes unterschieden. Somit ergaben sich unterschiedliche prozentuale Anteile positiver Zellen, je nachdem ob man nur das Tumorgewebe betrachtete oder den gesamten Ausschnitt. Bezogen auf die PD-L1-Expression gibt es in der Literatur unterschiedliche Scores, bei denen die Aussagekraft bzw. die Prognoserelevanz diskutiert wird. Betrachtet man nur die PD-L1-Expression der Tumorzellen spricht man beispielsweise vom *tumor proportion score* (TPS), der combined positive score (CPS) bezieht auch andere PD-L1-positive Zellen (Tumorzellen, Lymphozyten und Makrophagen) mit ein (119). In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Kombinationen untersucht: Es wurde jede Analyse der PD-L1-Expression sowohl einmal bezogen auf die Tumorzellzahl (TPS) als auch bezogen auf die Gesamtzellzahl (angepasster CPS – hier: kombinierter Tumor-Stroma-Score KTSS) durchgeführt. Aufgrund von Limitationen der digitalen Bildanalyse konnte keine Differenzierung zwischen einzelnen Zellen des (größtenteils gering repräsentierten) Stromagewebes erfolgen. Frühere Studien konnten PD-L1 in geringen Mengen zwar

auf anderen Zellen nachweisen (120), visuell ist aber davon auszugehen, dass in den von uns untersuchten Biopsien vorwiegend Tumorzellen PD-L1 exprimieren und der Anteil weiterer PD-L1-exprimierender Zellen als sehr gering einzuschätzen ist.

Der Anteil der PD-L1-positiven Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl wurde in drei Kategorien eingeteilt (90). Die Expression von <1% der Zellen, 1-50% und >50% wurde hierbei unterschieden und miteinander verglichen. Hierbei unterschied sich dann aber nur in den wenigsten Fällen die Einteilung der Gruppen beider Scores.

Tabelle 12: Anzahl der Patienten anhand des KTSS

<b>PD-L1-Expression Tumor-/Stromagewebe</b>	Häufigkeit	Prozent
<1%	20	14,6
1-50%	96	70,1
>50%	21	15,3
Gesamt	137	100,0

Tabelle 13: Anzahl der Patienten anhand des TPS

<b>PD-L1-Expression Tumorgewebe</b>	Häufigkeit	Prozent
<1%	25	18,2
1-50%	88	64,2
>50%	24	17,5
Gesamt	137	100,0

Im Mittel zeigten die Patienten in 19,6% der Gesamtzellen des untersuchten Gewebes und 21,3% der Tumorzellen eine PD-L1-Expression. Die Expression stellte sich über alle Tumore sehr heterogen dar und reichte von 0% bis 98%.

#### 4.1.8 Vergleich der Immunzellanzahl in Abhängigkeit der PD-L1-Expression

##### 4.1.8.1 CD3-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression

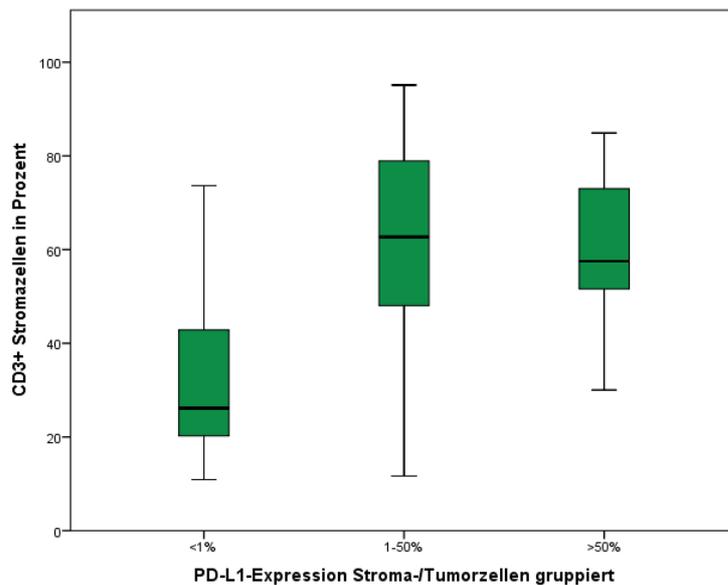


Abbildung 11: Boxplot: CD3-Infiltration in Abhängigkeit der PD-L1-Expression

In der Abbildung 11 findet sich eine Aufstellung der prozentualen CD3-Zellzahl im tumorumgebenden Gewebe in den definierten PD-L1-Kategorien.

Insgesamt konnte ein Mittelwert von 57,5% CD3-positiver T-Lymphozyten errechnet werden. Die Spannweite war sehr groß und reichte von 11% bis 95%.

Es zeigte sich eine (knapp nicht signifikant) höhere Anzahl CD3-positiver Zellen bei höherer PD-L1-Expression ( $p = 0,062$ ). Graphisch zeigte sich in einem Streudiagramm kein eindeutig linearer Zusammenhang.

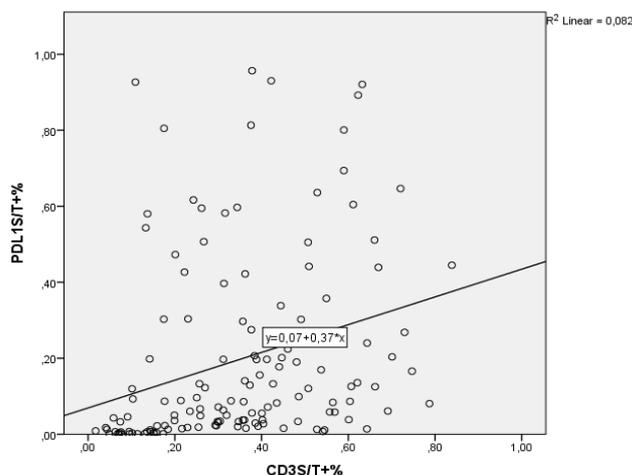


Abbildung 12: Beispiel Streudiagramm - Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression und CD3-positiven Immunzellen

#### 4.1.8.2 CD4-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression

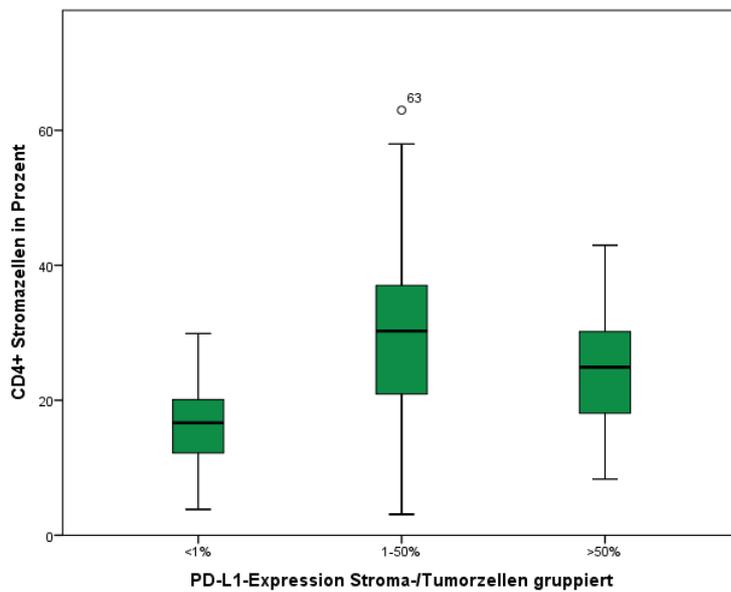


Abbildung 13: Boxplot: CD4-Infiltration in Abhängigkeit der PD-L1-Expression

In der Abbildung 13 findet sich eine Aufstellung der prozentualen CD4-Zellzahl bei den unterschiedlichen PD-L1-Kategorien.

Insgesamt konnte ein Mittelwert von 27,3% CD4-positiver T-Helferzellen errechnet werden. Die Spannweite war groß und reichte von 3% bis 63%.

Es zeigte sich eine nicht signifikant höhere Anzahl CD4-positiver Zellen bei höherer PD-L1-Expression ( $p = 0,849$ ). Graphisch zeigte sich in einem Streudiagramm kein eindeutig linearer Zusammenhang.

#### 4.1.8.3 CD8-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression

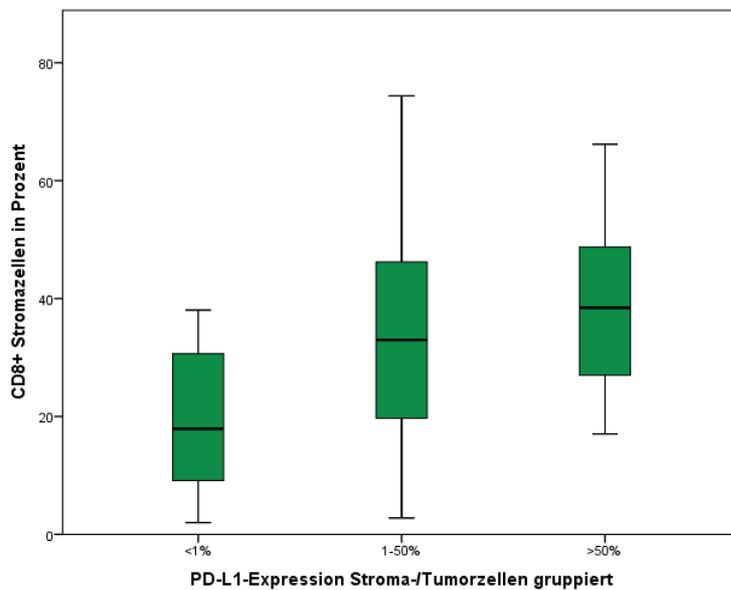


Abbildung 14: Boxplot: CD8-Infiltration in Abhängigkeit der PD-L1-Expression

In der Abbildung 14 findet sich eine Aufstellung der prozentualen CD8-Zellzahl bei den unterschiedlichen PD-L1-Kategorien.

Insgesamt konnte ein Mittelwert von 32,9% CD8-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten errechnet werden. Die Spannweite war groß und reichte von 2% bis 74%.

Es zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl CD8-positiver Zellen bei Anstieg der PD-L1-Expression ( $p < 0,001$ ). Graphisch zeigte sich in einem Streudiagramm kein eindeutig linearer Zusammenhang.

#### 4.1.8.4 CD56-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression

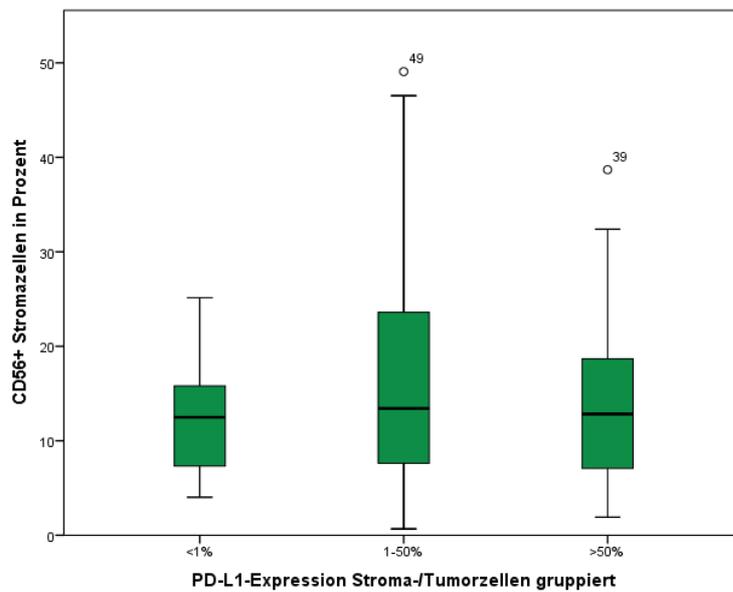


Abbildung 15: Boxplot: CD56-Infiltration in Abhängigkeit der PD-L1-Expression

In der Abbildung 15 findet sich eine Aufstellung der prozentualen CD56-Zellzahl bei den unterschiedlichen PD-L1-Kategorien.

Insgesamt konnte ein Mittelwert von 15,7% CD56-positiver natürlicher Killerzellen errechnet werden. Die Spannweite war groß und reichte von 1% bis 49%.

Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied der CD56-Positivität bei unterschiedlicher PD-L1-Expression ( $p = 0,357$ ). Auch graphisch zeigte sich in einem Streudiagramm kein linearer Zusammenhang.

#### 4.1.8.5 CD68-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression

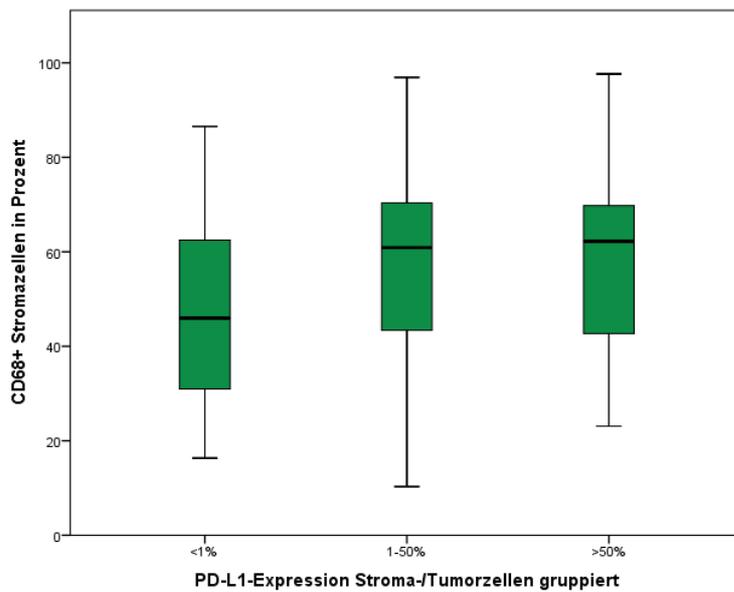


Abbildung 16: Boxplot: CD68-Infiltration in Abhängigkeit der PD-L1-Expression

In der Abbildung 16 findet sich eine Aufstellung der prozentualen CD68-Zellzahl bei den unterschiedlichen PD-L1-Kategorien.

Insgesamt konnte ein Mittelwert von 57,1% CD68-positiver Makrophagen errechnet werden. Die Spannweite war groß und reichte von 10% bis 98%.

Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied der CD68-positiven Zellzahl bei Anstieg der PD-L1-Expression ( $p = 0,926$ ). Graphisch zeigte sich in einem Streudiagramm kein eindeutiger linearer Zusammenhang.

#### 4.1.8.6 PD1-positive Immunzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression

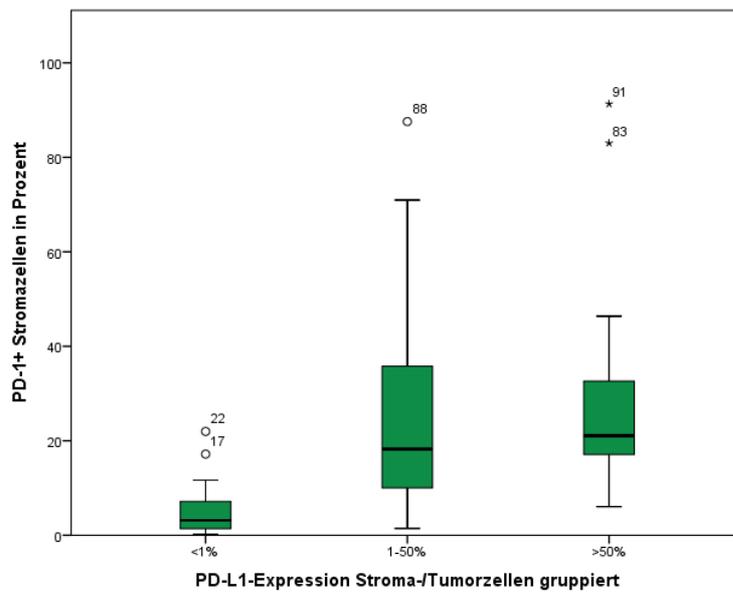


Abbildung 17: Boxplot: PD-1-Expression in Abhängigkeit der PD-L1-Expression

In der Abbildung 17 findet sich eine Aufstellung der prozentualen PD-1-Expression bei den unterschiedlichen PD-L1-Kategorien.

Insgesamt konnte ein Mittelwert von 22,9% PD-1-positiver Zellen errechnet werden. Die Spannweite war sehr groß und reichte von 0% bis 91%.

Es zeigte sich eine signifikant höhere PD-1-Expression bei Anstieg der PD-L1-Expression ( $p < 0,001$ ). Graphisch zeigte sich in einem Streudiagramm kein eindeutig linearer Zusammenhang.

#### 4.1.8.7 Regressionsanalyse

Es wurde zur zusammenfassenden Überprüfung des Einflusses der PD-L1 Expression auf das Immunzellinfiltrat in der Tumormikroumgebung eine (multivariate) Regressionsanalyse durchgeführt, in der die jeweiligen Immunzellmarker als abhängige Variable (Zielgröße) betrachtet wurden und die PD-L1 Expression als unabhängige Variable (Einflussgröße). Hierbei zeigten sich die PD-L1-Expression als signifikanter Einflussfaktor auf die Infiltration mit zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8) ( $p < 0,001$ ) und die Menge der PD-1-exprimierenden Immunzellen ( $p < 0,001$ ). Auf die Infiltration mit den restlichen Immunzellen scheint die PD-L1-Expression keinen Einfluss zu nehmen (CD4  $p = 0,849$ ; CD56  $p = 0,357$ ; CD68  $p = 0,926$ ). Bei der CD3-Infiltration zeigten sich

grenzwertig nicht signifikante Werte ( $p=0,062$  bei Betrachtung aller PD-L1-positiven Zellen und  $p=0,051$  bei isolierter Tumorzellbetrachtung).

#### 4.1.9 Überlebenszeitanalyse

Erfasst wurden insgesamt 137 Patienten. Nach Abschluss der Erfassung waren noch 93 Patienten (67,9%) am Leben und wurden in den folgenden Analysen als zensiert betrachtet. Das mediane Gesamtüberleben konnte aufgrund der geringen Anzahl von Ereignissen (44 Tote von 137 Patienten insgesamt) nicht berechnet werden.

Als Startpunkt gilt das Datum der pathologischen Begutachtung des Gewebes und Identifikation der Malignität. Das Gesamtüberleben definierte sich also als Zeitraum zwischen der histologischen Diagnosesicherung und dem Tag des Versterbens bzw. der Zensierung des Patienten. Es wurde für die Überlebensanalysen nicht zwischen tumorassoziierten und tumorunabhängigen Todesursachen unterschieden.

##### 4.1.9.1 Gesamtüberleben

Es ergab sich eine 1-Jahresüberlebensrate (JÜR) von 83,2%, eine 2-JÜR von 71,6% und nach 5 Jahren waren noch 51,9% der Patienten am Leben.

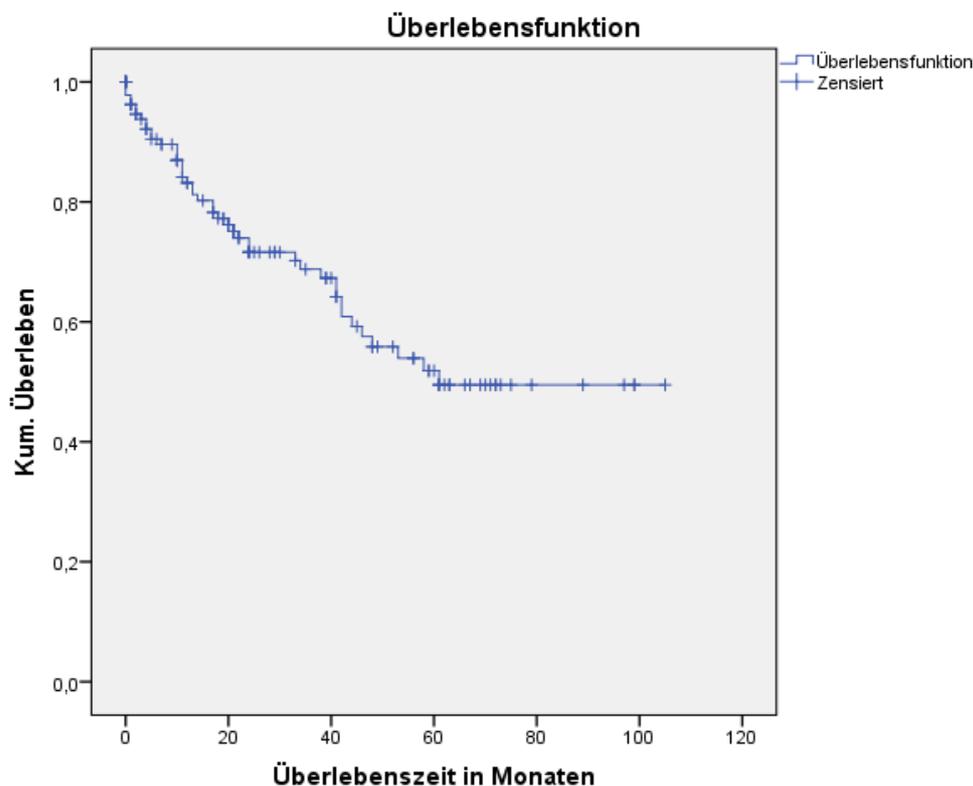


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve: Gesamtüberleben in Monaten

Tabelle 14: Überleben der Patienten bezogen auf Jahre in Prozent

	Kaplan-Meier-Schätzer in Prozent
6-Monats-Überleben	90,4
1-Jahres-Überleben	83,2
2-Jahres-Überleben	71,6
3-Jahres-Überleben	68,8
4-Jahres-Überleben	55,9
5-Jahres-Überleben	51,9

Um die möglichen Einflussfaktoren auf das Überleben genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Kaplan-Meier-Kurven erstellt und Log Rank-Tests durchgeführt.

#### 4.1.9.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von dem UICC-Stadium

Es zeigte sich wie zu erwarten ein signifikanter Unterschied der Prognose zwischen den UICC-Stadien der Tumorerkrankung ( $p < 0,001$ ). Die Überlebenszeit im Tumorstadium I war signifikant höher als die aller anderen Tumorstadien. Auch das sehr eingeschränkte Überleben des am weitesten fortgeschrittenen Tumorstadiums IVc unterschied sich signifikant vom Rest ( $0,000 > p < 0,048$ ). Das Tumorstadium IVa unterschied sich nicht signifikant von den anderen Stadien (ausgenommen I und IVc).

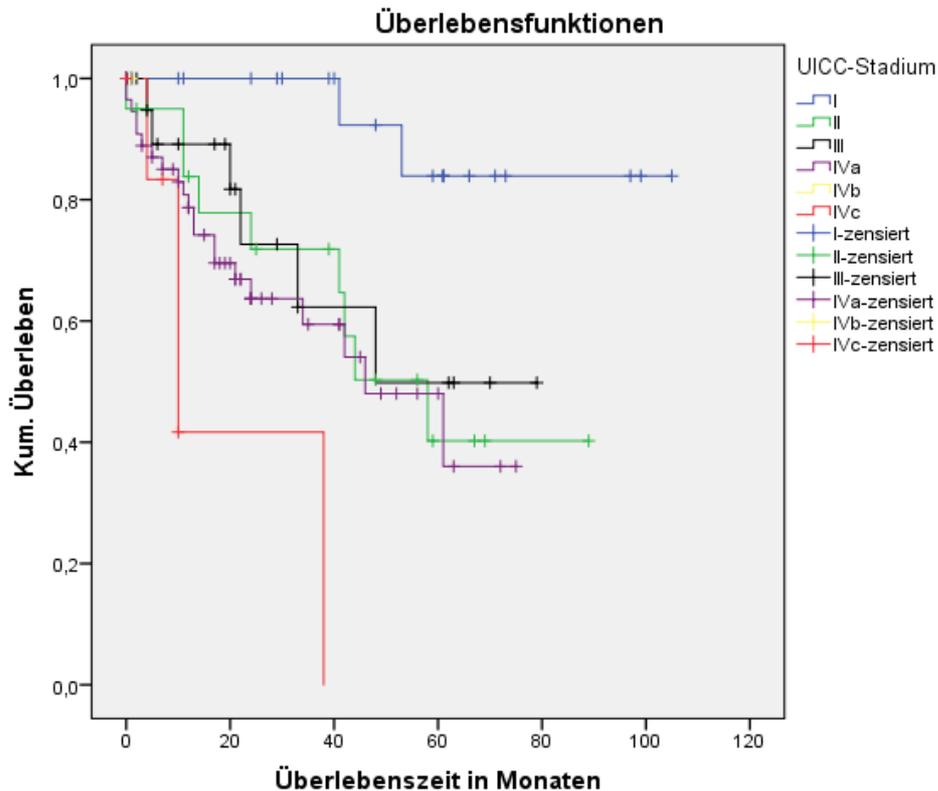


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten nach UICC-Stadium

#### 4.1.9.3 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression (3 Kategorien)

Zur Untersuchung des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit der PD-L1-Expression wurden die Patienten in die oben beschriebenen drei Kategorien aufgeteilt. In der ersten Gruppe befanden sich 20 Patienten mit geringer bzw. gar keiner PD-L1-Expression (unter 1% positiver Zellen), in der zweiten Gruppe waren 96 Patienten mit mittlerer Expression (1-50% der Zellen exprimierten PD-L1) und in der dritten Gruppe fanden sich 21 Patienten mit hoher PD-L1-Expression (>50%).

Tabelle 15: Verteilung der Patienten in den PD-L1-Kategorien (KTSS)

PD-L1-Expression Tumor-/Stromazellen	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse (Tod)	Zensiert	
			Anzahl	Prozent
<1%	20	11	9	45,0%
1-50%	96	28	68	70,8%
>50%	21	5	16	76,2%
Gesamt	137	44	93	67,9%

Tabelle 16: Verteilung der Patienten in den PD-L1-Kategorien (TPS)

PD-L1-Expression Tumorzellen	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse (Tod)	Zensiert	
			Anzahl	Prozent
<1%	25	13	12	48,0%
1-50%	88	25	63	71,6%
>50%	24	6	18	75,0%
Gesamt	137	44	93	67,9%

Hierbei fanden sich signifikante Unterschiede im Überleben der 3 Gruppen ( $p=0,033$ ; Log Rank-Test). Die Gruppe mit niedriger PD-L1 Expression nach KTSS zeigte im Langzeitverlauf ein signifikant schlechteres Überleben als die anderen beiden Gruppen ( $p=0,029$  beim Vergleich mit mittlerer Expression und  $p=0,021$  beim Vergleich mit hoher Expression). Betrachtet man den unmittelbaren Zeitraum nach Diagnosestellung unterscheiden sich die Überlebensraten noch nicht deutlich, erst im längerfristigen Verlauf treten deutliche Unterschiede auf.

Die mediane Überlebensdauer konnte nur für die Gruppe mit der niedrigsten Expression errechnet werden (Median: 151 Wochen – ca. 34 Wochen; 95%-Konfidenzintervall: 83,84 - 218,16 Wochen), für die restlichen beiden Gruppen lag die Ereigniszahl <50% der Gesamtpatienten und der Median war nicht bestimmbar.

Betrachtet man nur die Expression der Tumorzellen (TPS) zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,072$ ).

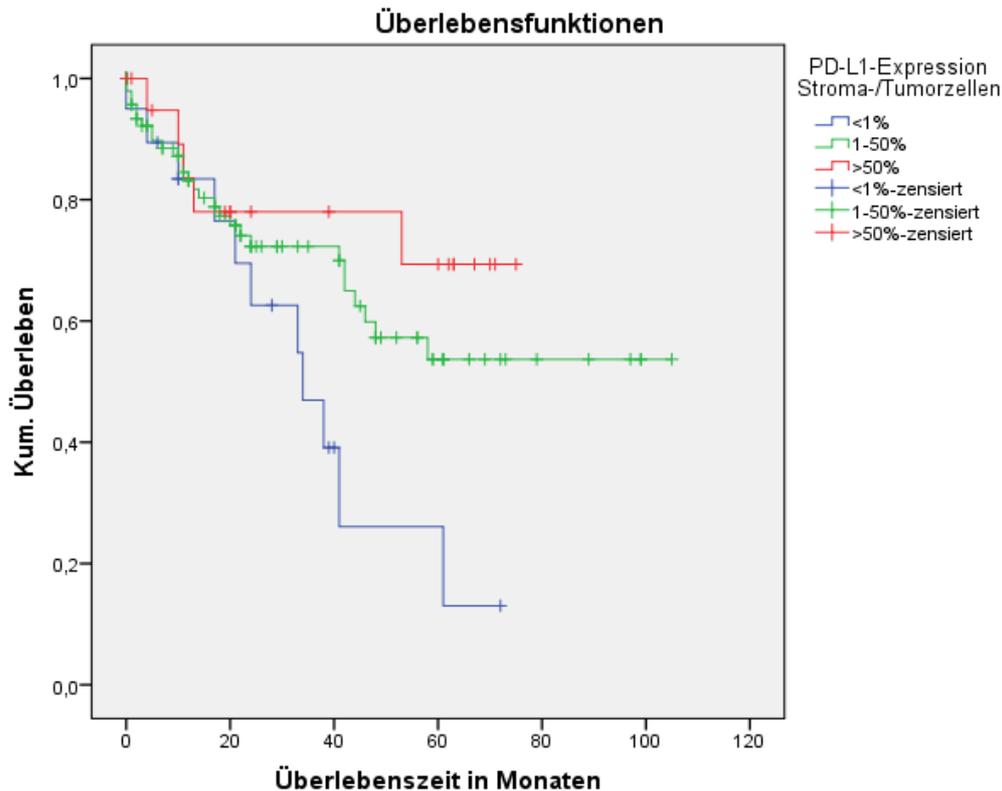


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten nach PD-L1-Expression

#### 4.1.9.4 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression (2 Gruppen)

Teilt man die Patienten anhand der PD-L1- Expression in nur zwei Gruppen auf (unter 1% Expression und über 1% Expression), werden die Unterschiede der Überlebenszeit noch signifikanter ( $p=0,013$ ; Log Rank-Test). In der Gruppe mit sehr geringer PD-L1-Expression befinden sich nach dieser Aufteilung 20 Patienten, die restlichen 117 Patienten sind der Gruppe mit höherer PD-L1-Expression zuzuordnen. Das mediane Überleben in der PD-L1 negativen Gruppe beträgt 34 Monate (95%-Konfidenzintervall: 18,4 - 49,6 Monate).

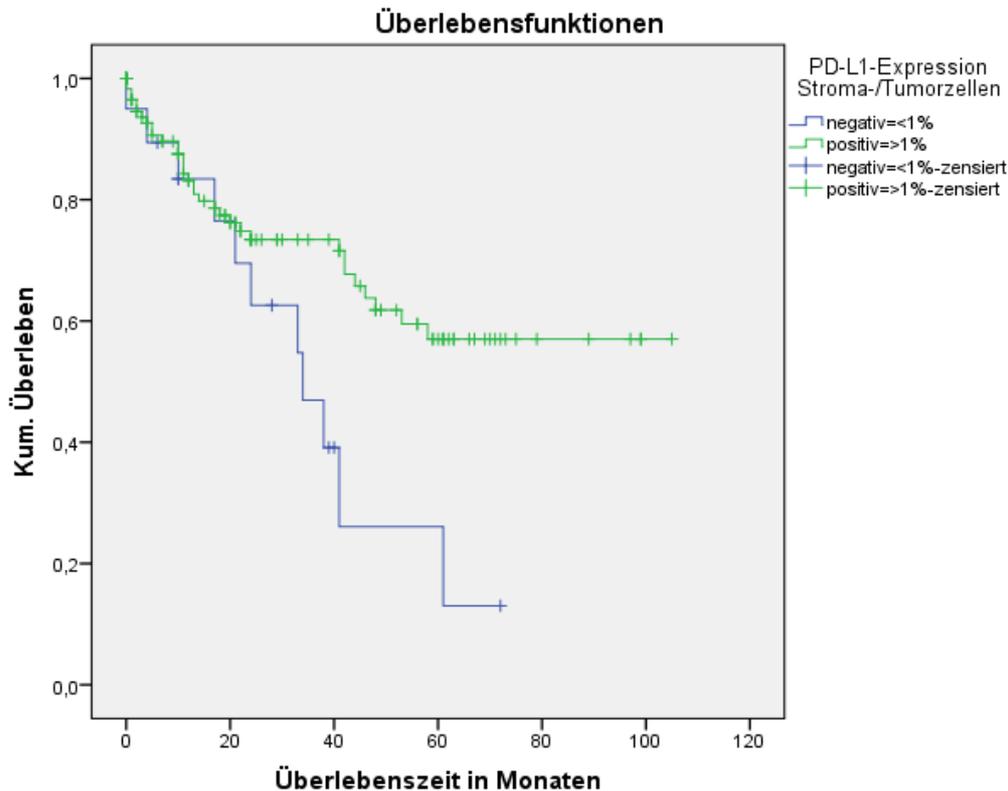


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten nach PD-L1-Expression (2 Gruppen)

#### 4.1.9.5 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Immunzellinfiltration

Für die Analyse des Überlebens in Abhängigkeit der vorliegenden Immunzellinfiltration wurden die Patienten anhand des prozentualen Anteils der jeweiligen Immunzellen im tumorumgebenden Gewebe in vier Quartile unterteilt: 0-25%, 26-50%, 51-75% und 76-100%. Diese Gruppen wurden dann innerhalb des zugehörigen Markers mittels Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier verglichen.

Es zeigte sich einzig die CD3-Infiltration (T-Lymphozyten allgemein) als signifikanter Prognosefaktor ( $p=0,029$ ; Log Rank-Test). Patienten mit einer niedrigen Anzahl tumorinfiltrierender T-Lymphozyten zeigten verglichen zu Patienten mit einer mittleren Anzahl infiltrierender T-Lymphozyten (26-76%) ein signifikant schlechteres Überleben ( $p=0,009$  und  $p=0,016$ ; Log Rank-Test). Eine extrem hohe CD3-Infiltration ( $>75\%$ ) zeigte jedoch keine Überlebensvorteile.

Alle anderen Immunzellmarker (CD4  $p=0,769$ ; CD8  $p=0,941$ ; CD56  $p=0,989$ ; CD68  $p=0,361$ ; Log Rank-Test) waren nicht assoziiert mit einem verbesserten bzw.

verschlechterten Überleben. Ebenso war die Expression von PD-1 nicht signifikant für die Prognose ( $p=0,651$ ; Log Rank-Test).

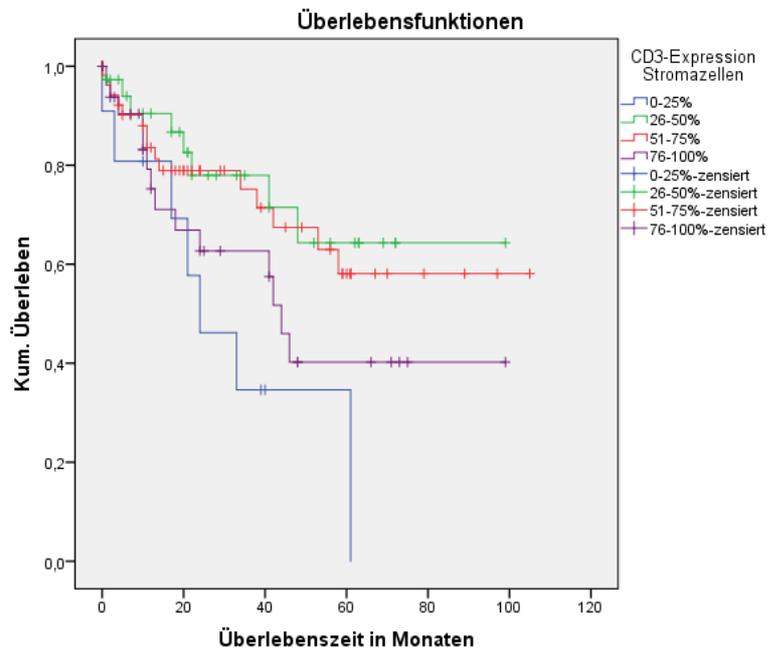


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der CD3-Expression

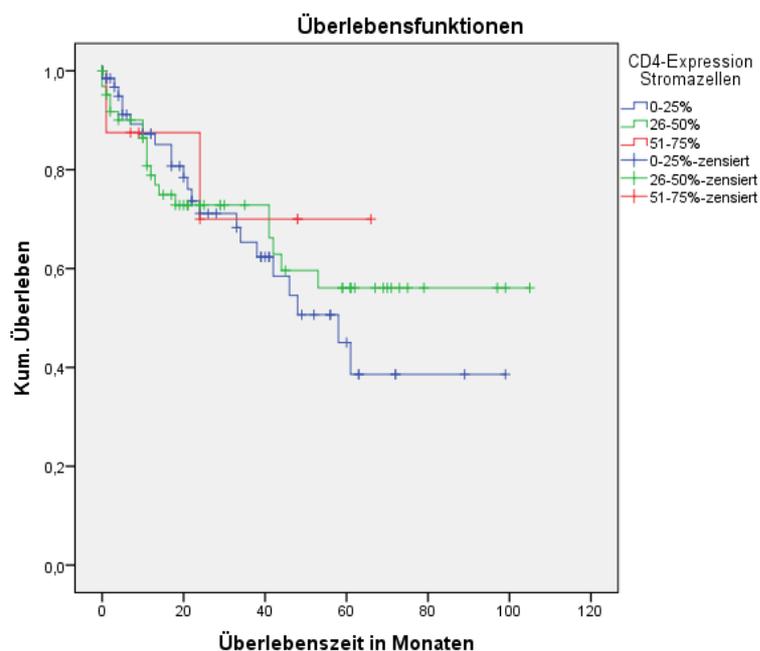


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der CD4-Expression

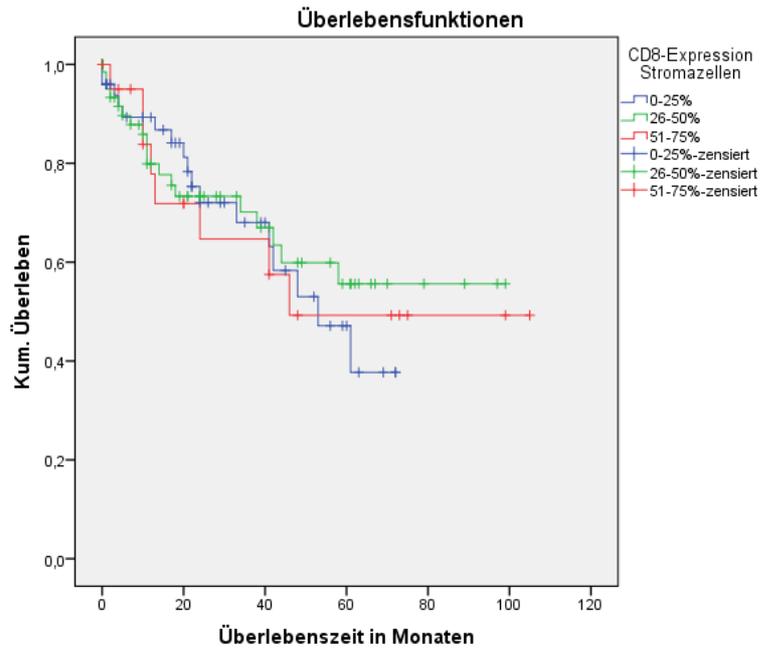


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der CD8-Expression

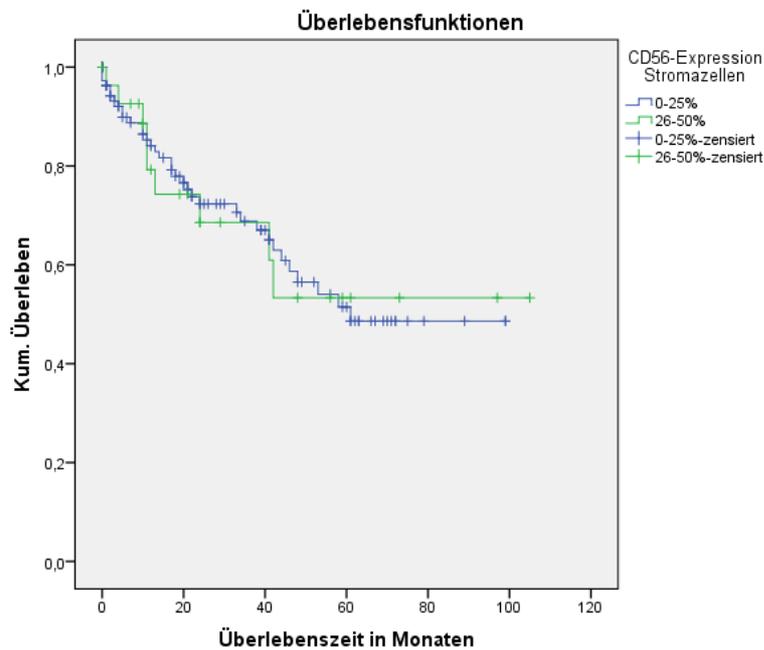


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der CD56-Expression

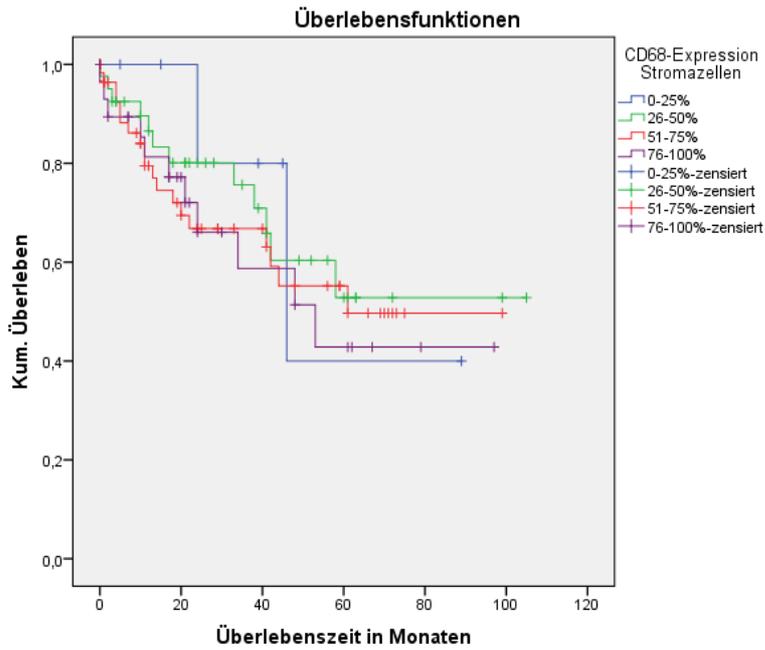


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der CD68-Expression

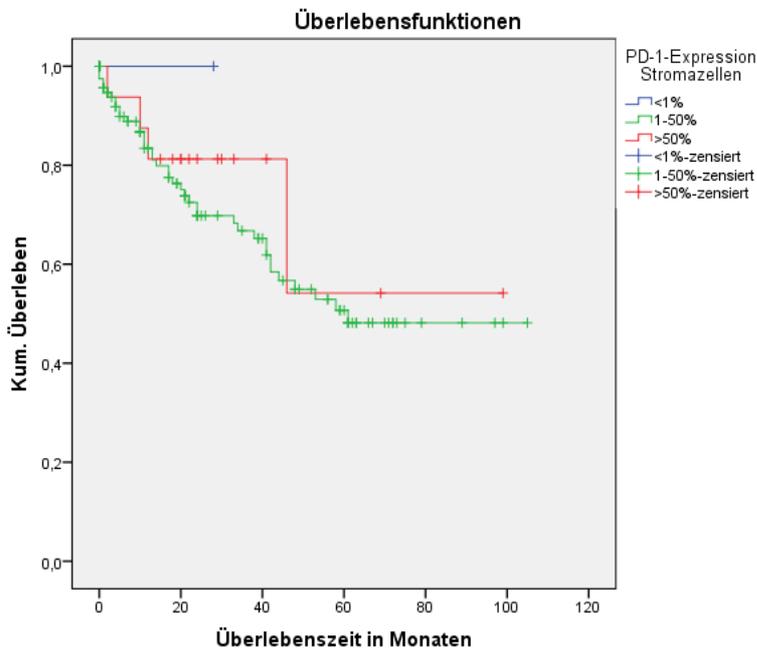


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der PD-1-Expression

Bei der CD3-Expression zeigten die meisten Patienten (67,2%) eine mittlere Expression (25-75%). Bei CD4 zeigten sich in 94,16% der Fälle niedrige Expressionsmuster zwischen 0 und 50%. Auch bei CD8 lagen die meisten Patienten (84,7%) eher im unteren Expressionsbereich (0-50%). Die CD56-Expression war eher schwach ausgeprägt und lag zu 79,6% im untersten Bereich (0-25%). Kein Patient zeigte eine CD56-Expression >50%. Bei der CD68-Expression zeigten sich ähnliche Expressionsmuster wie bei CD3; die meisten Patienten (ca. 73%) wiesen eine mittlere Expression zwischen 25% und 75% auf.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

Eine wesentliche Einschränkung unserer Studie ist die geringe Anzahl von Patienten, die kombiniert mit dem retrospektiven Design und teilweise nur lückenhaft dokumentierten Falldaten zu geringerer Signifikanz bei der Auswertung führt. Es wurden Patienten mit bösartigen Neubildungen der Lippe (C00), sonstiger Bereiche des Mundes – Wangenschleimhaut (C06), der Glandula parotis und anderen Speicheldrüsen (C07-C08), sowie jegliche Neubildungen des Larynx ausgeschlossen. Außerdem wurden nur Patienten eingeschlossen, die an der HNO-Klinik der Universitätsmedizin Mainz behandelt wurden und bei denen zumindest ein histologisches Präparat archiviert war. Es werden jedoch auch in anderen Fachabteilungen (wie beispielsweise der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie) Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches behandelt; somit ist unser Patientenkollektiv eher als eine Stichprobe anzusehen und darf nicht als Grundgesamtheit angesehen werden. Einige histologische Präparate waren bereits in Bearbeitung für andere Forschungsprojekte und standen somit unserer Auswertung nicht zur Verfügung; weitere wiesen nach der Bearbeitung/Färbung nicht mehr ausreichend Tumormaterial zur Begutachtung auf. Nach Durchsicht des Patientenmaterials wurden Patienten ausselektiert, bei denen insgesamt nur wenig Tumormasse verfügbar war, die nicht für Forschungszwecke ausreichte.

Die klinischen Daten der Patienten wurden größtenteils mithilfe einer Datenbank der HNO-Klinik erhoben, teilweise wurden auch die Krankenakten der Patienten gesichtet; einige Daten (wie z.B. der Alkohol-/Nikotinkonsum) waren hierbei nur sehr lückenhaft erhoben worden. Es erhielten in unserem Kollektiv auffällig wenige Patienten eine Immuntherapie als Tertiärtherapie mit den Antikörpern Pembrolizumab/Nivolumab, was darauf zurückzuführen ist, dass im Untersuchungszeitraum die meisten Immuntherapien noch nicht Bestandteil des empfohlenen Primär-Therapieregimes waren. Lag kein exaktes Todesdatum vor, da es zum Beispiel zu einem Versterben außerhalb der Klinik oder zu einem Wechsel der versorgenden Klinik im Krankheitsverlauf kam, wurde der Tag des letzten Kontakts ausgewertet und die Patienten „zensiert“. Dies führte dazu, dass signifikante Ergebnisse seltener erzielt werden konnten und das mediane Gesamtüberleben insgesamt als länger als herausgefunden anzusehen ist.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass es für die Beurteilung des PD-L1-Status eines Tumors nicht relevant ist, ob Gewebe vom Primärtumor, von Rezidivtumoren oder von Fernmetastasen für die immunhistochemische Untersuchung zu Rate gezogen wird (4). Allerdings ist es möglich, dass bei nur einer Stanzbiopsie pro Patient eine höhere oder auch geringere PD-L1-Expression vorgetäuscht wird, da diese immer nur einen kleinen Teil der Tumorgesamtheit repräsentiert und einer möglicherweise vorliegenden intratumoralen Heterogenität keine Beachtung geschenkt werden kann (121).

Die immunhistochemischen Färbungen wurden stets an Stanzbiopsien mit möglichst vielen Tumorzellen durchgeführt, was nur eine begrenzte Beurteilung des angrenzenden Gewebes zulässt. Das verfügbare Gewebe war nicht in jedem Falle zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. bei allen Patienten im gleichen Krankheitsstadium gewonnen worden, deshalb kann auch die Expression von PD-L1 bzw. das Vorhandensein von Immunzellen je nach vorheriger (endogener) Stimulation variieren (122). Ebenso waren manche Patienten bei Probenentnahme bereits mittels Bestrahlung oder Chemotherapie vorbehandelt, was auch zu einer Veränderung der lokalen Gegebenheiten in der Tumorumgebung führen kann.

Für den Nachweis von Oberflächenmarkern (wie PD-L1) gibt es abgesehen von der Immunhistochemie auch andere Nachweismethoden, wie z.B. den mRNA-Nachweis, was zu unterschiedlich aussagekräftigen Ergebnissen führen kann (97). Es existieren auch unterschiedliche Antikörper zur immunhistochemischen Detektion, bei denen sich in Vergleichsstudien stark unterschiedliche Färbemuster und -intensitäten zeigten (123). Letztendlich hat die digitale Bildanalyse trotz vieler Vorteile, wie beispielsweise einer größeren Objektivität durch bessere Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit auch einige Limitationen. Durch die Heterogenität im Erscheinungsbild entarteter Zellen ist das Erkennen der Tumorzellen durch das Programm oft erschwert und die Einordnung in die Gruppen Tumor-/Stromagewebe erfolgte teilweise ungenau und musste manuell angepasst werden. Außerdem gelang eine genaue Differenzierung der einzelnen Zellen im tumorumgebenden Gewebe durch ähnlichen Aufbau der Zellstrukturen nicht.

Die Expression von Programmed-Death-Liganden/-Rezeptoren kann mit verschiedenen Methoden/Scores beurteilt werden. Beispiele hierfür sind der Tumorproportionscore (TPS) und der kombinierte positive Score (CPS). TPS ist als der Prozentsatz der Tumorzellen mit membranöser PD-L1-Expression definiert, CPS ist definiert als die

Anzahl PD-L1-positiver Tumor- und mononukleärer Immunzellen (Lymphozyten und Makrophagen) geteilt durch die Gesamtzahl der Tumorzellen multipliziert mit 100. Beide Scores reichen von 0 bis 100; es gibt außerdem unterschiedliche Cut-off Werte zur Definition der PD-L1-Positivität. Ob ein Tumor bereits ab einer PD-L1-Expression von >1% der Zellen, ab >5% oder gar erst ab über 50% exprimierender Zellen als „positiv“ gewertet wird, ist je nach Studie stark unterschiedlich (67). Durch Verwendung des CPS anstatt des TPS kann somit nicht zwischen Tumorzellen und Immunzellen differenziert werden. In Studien, in denen sowohl der CPS als auch der TPS bestimmt und verglichen wurden, zeigten sich aussagekräftigere Ergebnisse bei der Auswertung des PD-L1-Status mit dem CPS (67, 72, 109). Somit zeigt sich der CPS im Vergleich als besserer Parameter zur Bewertung der PD-L1-Positivität, was auch in unserer Analyse mithilfe des angepassten KTSS bestätigt wurde. Es wurde ein signifikant schlechteres (Langzeit-)Überleben bei PD-L1-KTSS<1%, verglichen zur Analyse mittels TPS, die keine signifikanten Überlebensunterschiede der Gruppen zeigte, nachgewiesen. In den folgenden Auswertungen wurde dann ausschließlich der kombinierte Tumor-Stroma-Score verwendet, da hiermit insgesamt signifikantere Ergebnisse erzielt werden konnten.

Die von uns verwendeten immunhistochemischen Marker für den Immunzellnachweis sind teilweise sehr unspezifisch und können auf verschiedene Immunzellen hinweisen. So ist CD3 als T-Lymphozyten-Marker bekannt, kann aber ebenso auf NK-Zellen exprimiert werden. CD4 ist sowohl auf T-Helferzellen nachweisbar als auch auf regulatorischen T-Zellen mit abweichenden Funktionen (124).

Auffällig war, dass die Auswertung des NK-Zell-Markers CD56 überwiegend eine Färbung von Muskelgewebe zeigte. Die Färbung des Markers PD-L2 lieferte keine verwertbaren Ergebnisse, da nahezu alle Zellen als positiv gewertet werden mussten, wodurch keine differenzierten Rückschlüsse gezogen werden konnten.

Da bei der Auswertung auffiel, dass sich die separat erhobenen Werte der intratumoralen bzw. stromalen PD-L1-Expression und des Immunzellinfiltrates nicht stark unterschieden, wurde bei der endgültigen Auswertung auf die Unterscheidung der Lokalisation der gefärbten Zellen verzichtet. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass unsere Stanzbiopsien hauptsächlich aus Tumorgewebe bestanden und teilweise wenig bis gar kein Stroma aufwiesen. Auch die Grenzzone am Tumorrand wurde nicht separat begutachtet, obwohl diese häufig ein besonders dichtes Immunzellinfiltrat

aufweist (125). Es ist ebenso wichtig zu unterscheiden, ob PD-L1 von Immunzellen oder von Tumorzellen exprimiert wird. Einige Autoren konnten nur einen positiv prognostischen Wert von PD-L1-exprimierenden Immunzellen belegen (33).

Es wurde bei unserer Auswertung nicht zwischen der genauen Lokalisation des HNSCC unterschieden, obwohl bereits gezeigt wurde, dass beispielsweise das Überleben und die Lymphozyten-Infiltration abhängig von der Tumorlokalisierung sehr schwanken können. Die 5-Jahres-Überlebensraten von Larynx-Karzinomen sind beispielsweise als deutlich höher einzuschätzen als die von Mundhöhlen-, Oropharynx- und Hypopharynx-Karzinomen (126).

Das progressionsfreie Überleben konnte nicht ermittelt werden, da keine Daten zu Rezidiven erhoben wurden. In früheren Studien fiel auf, dass es vor allem bei mit Immuntherapie behandelten HNSCC häufig zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens, jedoch ohne Verlängerung des progressions- bzw. tumorfreien Überlebens kam (127).

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Dissertation war es, mittels immunhistochemischer Untersuchung der Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches die Tumormikroumgebung zu erforschen und das Vorliegen verschiedener zellulärer Marker mit klinischen Gesichtspunkten in Verbindung zu bringen. Es sollte der Einfluss der infiltrierenden Immunzellen und immunsupprimierenden Mechanismen auf die Tumorbiologie und somit auf die Krankheitsprogression und das Überleben geprüft werden. Spezifische zelluläre Strukturen könnten in Zukunft zur Therapieplanung und Erforschung neuer Therapiestrategien herangezogen werden. Es wäre erstrebenswert, mithilfe von immunhistochemisch nachweisbaren Oberflächenmarkern, spezifische Tumoreigenschaften und die Prognose der Patienten einschätzen zu können. Um den Erfolg der Immuntherapien zu maximieren, könnten Patienten mithilfe von prädiktiven Biomarkern identifiziert werden, die am wahrscheinlichsten auf eine bestimmte Immuntherapie ansprechen.

Es wurde nach Zusammenhängen zwischen der PD-L1-Expression und klinischen Parametern, sowie Unterschieden in der Immunogenität gesucht. Abschließend wurden die potenziellen Biomarker auf ihren Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten untersucht. Zusammenfassend zeigte sich eine signifikant stärkere PD-L1-Expression des Tumors bzw. der Tumormikroumgebung beim männlichen Geschlecht, jedoch mit nur schwacher Effektstärke. Andere klinische Parameter, wie beispielsweise das Alter,

die Lokalisation, die TNM- und UICC-Klassifikation und Noxen (Alkohol und Nikotin) zeigten keinen signifikanten Zusammenhang mit der PD-L1-Expression.

Hinsichtlich des Einflusses der PD-L1-Expression auf die Immunogenität des Tumors zeigten sich hochsignifikant mehr zytotoxische T-Lymphozyten (CD8+) und PD-1-positive Zellen bei stärkerer PD-L1-Expression. Es zeigte sich ebenso ein deutlicher Zusammenhang zwischen hoher PD-L1-Expression und der Infiltration mit CD3-positiven T-Lymphozyten, es reichte hierbei aber nicht für ein signifikantes Ergebnis. Auch scheinen mehr T-Helferzellen (CD4+) in der Tumormikroumgebung zu sein, wenn mehr PD-L1 exprimiert wird. Auf andere Immunzellen, wie Natürliche Killerzellen und Makrophagen, hatte der PD-L1-Status keinen nachweisbaren Einfluss.

In der Überlebenszeitanalyse zeigte sich die PD-L1-Positivität bezogen auf alle Zellen der Tumormikroumgebung als negativer prognostischer Faktor.

Die Betrachtung der Dichte der Immunzellen als prognostischer Marker ergab bei einer geringen Infiltration mit CD3+-T-Lymphozyten ein signifikant schlechteres Überleben. Alle anderen untersuchten Immunzellen hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der eingeschlossenen Patienten.

### 5.2.1 Patientenkollektiv

Eine Studie mit hoher Teilnehmerzahl (n=5469) von Lop et al an HNSCC zeigte ein Durchschnittsalter von 61,9 Jahren bei Erstdiagnose der Tumorerkrankung (24). Das Durchschnittsalter in unserer Kohorte zeigte sich mit 63,1 Jahren ähnlich und scheint somit repräsentativ zu sein.

Die Beurteilung und der Vergleich des Überlebens nach einer gewissen Zeit (z.B. 5-Jahres-Überleben) gestaltete sich schwierig. Viele Studien schlossen nur HPV-negative/positive, weit fortgeschrittene oder mit speziellen Therapien behandelte HNSCC ein. So fanden de Ruiten et al bei ihrer Studie an HPV-negativen HNSCC im Stadium III und IV ein 3-Jahresüberleben von 58% (verglichen zu 69% in unserer Studie). Hierbei war der Beobachtungszeitraum deutlich länger (53 Monate vs. 29 Monate), was in Zusammenschau mit der HPV-Negativität und dem fortgeschrittenen Tumorstadium die kürzere Überlebensrate erklären könnte (56).

Der Anteil von PD-L1-positiven Tumoren bei HNSCC schwankt in der Literatur stark. Dies ist mitunter darauf zurückzuführen, dass unterschiedliche Cut-Off-Werte die „Positivität“ definieren und verschiedene Scoring-Systeme genutzt werden. Geht man von

einer PD-L1-Positivität ab einer Expression auf über 50% der Tumorzellen aus, kommt man auf bis zu 60% der HNSCC, die als PD-L1-positiv zu werten sind (61). Auch in anderen Studien, die PD-L1 semiquantitativ bewerteten, lag die Rate an deutlich PD-L1-exprimierenden Tumoren bei ca. 50% (128). Bei einem CPS-Cut-Off-Wert von  $\geq 1\%$  fanden sich 85% der Patienten als PD-L1-positiv, bei CPS  $\geq 20\%$  nur noch 15% der Patienten (129). Metaanalysen, die speziell die PD-L1-Expression untersuchten, zeigen auch bei gleichem Cut-Off (CPS  $\geq 1\%$ ) sehr heterogene Ergebnisse, die von 40% bis 82% reichen (130). Erstaunlicherweise sprechen jedoch nur ca. 15% der fortgeschrittenen HNSCC auf eine Anti-PD-(L)1-Immuntherapie an, obwohl so viele mehr PD-L1 positiv sind (131). Es muss also angeborene oder erworbene Resistenzen gegen die eingesetzten Immuntherapien geben. Man spricht von einer bis zu 60-prozentigen primären Resistenz gegen eine Immuncheckpoint-Blockade bei HNSCC. Hierfür könnten mehrere Mechanismen eine Rolle spielen; die Expression anderer inhibitorischer Rezeptoren, die Aktivierung immunsuppressiver Signalwege in der Tumormikroumgebung und eine verminderte Immunogenität des Tumors durch geringe Immunzellinfiltration (132). Es kommt zu einer Anpassung der Tumorzelle mit Fehlfunktion der Antigen-präsentierenden Maschinerie, zu Veränderungen des Zellzyklus und zur Beeinträchtigung der T-Zell-Proliferation und -Funktion durch Mutationen in den Interferon- $\gamma$ -regulierenden Genen. Außerdem könnte die gleichzeitige Einnahme anderer Medikamente, wie z.B. Antibiotika im Rahmen von Infektionen, über eine Beeinflussung des Darmmikrobioms die Immuncheckpoint-Blockade dämpfen (133).

### 5.2.2 Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und der PD-L1-Expression

Eine verglichen zu unseren Ergebnissen gegensätzliche Geschlechterverteilung zeigte eine Metaanalyse oraler Plattenepithelkarzinome, bei der in einer großen Kohorte insgesamt zweimal so häufig Frauen PD-L1-positiv waren wie Männer (134).

Aufgrund der immunsupprimierenden Eigenschaften der PD-L1-Expression auf Tumorzellen, sollte bei schlechter differenzierten, fortgeschrittenen bzw. metastasierten Tumoren (höheres TNM- bzw. UICC-Stadium) durch den Überlebensvorteil der Tumorzellen proportional häufiger PD-L1 nachzuweisen sein (99).

Auch wenn in unserer Studie keine signifikanten Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und der PD-L1-Expression nachgewiesen werden konnten, gibt es Hinweise darauf, dass PD-L1 auf Tumorzellen mit dem Geschlecht (v.a. Frauen

positiv), dem Patientenalter, der Lokalisation, dem Differenzierungsgrad des Tumors und dem Lymphknotenstatus korrespondiert. Es zeigt sich eine höhere PD-L1-Expression der Tumorzellen mit steigendem Alter sowie bei Mundhöhlen- und Oropharynx-Karzinomen und eine deutlich geringere bei Hypopharynx-Karzinomen. Die PD-L1-Expression auf Immunzellen ist außerdem mit den Risikofaktoren Rauchen (Nicht-Raucher mehr) und Alkohol (Nicht-Trinker mehr) assoziiert (4).

Auch bei anderen Tumorerkrankungen, wie beispielsweise dem NSCLC, konnten bislang keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern (z.B. Geschlecht, TNM-Stadium, Rauchen) und der Expression von PD-L1 hergestellt werden. Einzig der Differenzierungsstatus (Grading) zeigte sich hier als Einflussfaktor (135). Für HNSCC ist bisher insgesamt kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Tumor-PD-L1-Expression und klinischen Faktoren, wie beispielsweise dem Geschlecht, dem Alter, dem Noxenabusus oder der TNM-Klassifikation nachgewiesen worden (91, 136).

### 5.2.3 Immunzellinfiltrat in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression

Das Immunzellinfiltrat in der Tumorumgebung ist abhängig von vielen Faktoren und lässt sich nicht alleine durch die PD-L1-Expression erklären. De Meulenaere et al fanden heraus, dass eine hohe Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten mit einem niedrigeren T-Stadium und einem positiven HPV-Status assoziiert war (137). Auch die anatomische Lokalisation kann eine unterschiedliche Infiltration mit Immunzellen bedingen, was durch die Nähe zu immunaktivem Gewebe erklärbar ist. Es wurde bei oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen eine höhere Infiltration mit T-Lymphozyten (CD4+, CD8+) verglichen zu laryngealen, hypopharyngealen und Mundhöhlen-SCC festgestellt (74).

Der in unserer Studie nicht erhobene HPV-Status hat einen deutlichen Einfluss auf das Immunzellinfiltrat, da die virale Infektion das Immunsystem zu triggern scheint. Somit weisen HPV-positive Tumore eine signifikant höhere Dichte an T-Lymphozyten (CD3-/CD4-/CD8-positiv) und PD-1-positiven Immunzellen auf. Ein Einfluss der HPV-Infektion auf die PD-L1-Expression konnte jedoch nicht belegt werden (131).

Durch die hemmende Wirkung auf das Immunzellwachstum, sollte eine vermehrte PD-L1-Expression auch eine verminderte Anzahl von Immunzellen bedingen. Demgegenüber stehen Untersuchungen, die keinen signifikanten Zusammenhang zwischen PD-

L1 und dem T-Lymphozyten-Infiltrat beschreiben (4, 90), was dadurch erklärt wird, dass bei dem vermehrten Nachweis von PD-L1 insgesamt sehr wenige tumorinfiltrierende Lymphozyten nachweisbar waren. Dies führte zum Vorschlag, nicht nur den binären (positiv/negativ) PD-L1-Status bezogen auf einen Schwellenwert zu berücksichtigen, sondern vielmehr das Verteilungsmuster von PD-L1 auf den Tumorzellen und ihr gemeinsames Vorkommen mit Immunzellen zu betrachten (131).

Widersprüchliche Ergebnisse lieferten Studien, bei denen eine hohe PD-L1-Expression mit einer vermehrten T-Lymphozyten-Infiltration in der Tumorumgebung assoziiert war (56, 91, 138, 139); insgesamt konnte hierdurch jedoch nicht unbedingt eine Verbesserung des Gesamtüberlebens erzielt werden, was auf andere bedeutsame Faktoren für das Überleben der Patienten, unabhängig von der Tumor-Immunabwehr, aufmerksam macht. Eine höhere Anzahl von TIL bei starker PD-L1-Expression wirkt auf den ersten Blick paradox, wird von den Autoren aber dadurch erklärt, dass die vermehrte PD-L1-Expression eine Antwort des Tumors auf die laufende Immunreaktion des Wirtes sein kann, um dem Immunangriff zu entkommen und somit ein Marker der Immunevasion – unabhängig von dessen Effektivität – sein könnte (140). Hierbei sei die PD-L1-Expression durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  im Rahmen der Zytolyse durch CD8+-Zellen stimulierbar. Auch wenn die Resistenzmechanismen letztlich ein Überleben der Tumorzellen ermöglichen, kann das Tumorstadium dennoch teilweise gehemmt werden und zu einem besseren Überleben führen als bei Patienten mit wenig Antitumorreaktion (141).

Auch wenn das Vorliegen von PD-L1 und PD-1 als Rezeptor/Ligand-Komplex proportional zueinander sein sollte, ließ sich in der Vergangenheit kein signifikanter Zusammenhang darstellen (140).

#### 5.2.4 Überlebenszeit in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression

Obwohl die endgültigen Auswirkungen des PD-L1-Signalweges im Tumor nicht vollständig geklärt sind, wird angenommen, dass die PD-L1-Expression auf Tumorzellen deren Immunogenität schwächt, die Wirts-Immunantwort durch Hemmung der T-Zell-Proliferation und -Funktion, sowie Apoptose spezifischer T-Lymphozyten hemmt und somit zu Immun-Escape und Tumorstadium führt (104, 142-145).

Für die PD-L1-Expression des Tumors bzw. der Tumormikroumgebung als Prognosefaktor gibt es eine kontroverse Diskussion. Während einige Studien PD-L1 als

positiven prognostischen Marker darstellen, der zu einem signifikant verbesserten Überleben (wenn auch teilweise nur von wenigen Monaten - 9,5 Monate vs. ca. 6 Monate bei PD-L1-Negativität) der exprimierenden Patienten führt (1, 34, 91, 138, 146), gibt es ebenso Studien, die bei PD-L1-Positivität (teilweise kombiniert mit anderen klinischen Patientencharakteristika) ein vermindertes Überleben beobachteten (136, 147).

Große Metaanalyse-Studien an HNSCC konnten zusammengefasst keinen klaren Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und der Prognose nachweisen (134, 147-149). Schneider et al zeigten einen Trend zu einer besseren Prognose bei höherer PD-L1-Expression (148). Kommt es in Zusammenhang mit der PD-L1-Positivität zu einer Herunterregulierung der MHC-1-Expression der Tumorzellen, zeigte sich ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben. Die MHC-1-Herabregulation auf der Oberfläche von Tumorzellen kann somit als Immun-Escape-Mechanismus angesehen werden; MHC-1-Moleküle können dadurch den zytotoxischen T-Lymphozyten keine Tumorantigene mehr präsentieren und die T-Zell-vermittelte Toxizität gegen Tumorzellen wird geschwächt (102, 150).

Die unterschiedlichen Ergebnisse sind auf verschiedene Faktoren zurückzuführen: es wurden teilweise Patienten eingeschlossen, die einer Immuntherapie zugeführt wurden und somit bei PD-L1-/PD-1-Positivität bessere Chancen auf ein Therapieansprechen haben (1). Dies macht die dort beobachteten verbesserten Überlebensraten wenig vergleichbar mit unseren, da in unserer Kohorte nur insgesamt zwei Patienten einer Immuntherapie als Tertiärtherapieoption zugeführt wurden. Außerdem wurden in einigen Studien nur Patienten mit bereits weit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen eingeschlossen, was per se die Prognose schon weitreichend einschränkt. Eine große Metaanalyse, die den Krankheitsverlauf von mit Immuntherapie (PD-1/-L1-Inhibitoren) behandelten R/M HNSCC verglich, hatte bei insgesamt 1088 Patienten eine ähnliche Geschlechterverteilung wie in unserem Patientenkollektiv. Es waren 81,2% Männer betroffen, mit einem Durchschnittsalter von ca. 59,9 Jahren. Hierbei zeigte sich ein verbessertes Gesamtüberleben von Patienten mit PD-L1-positiven ( $\geq 1\%$ ) Tumoren in der Kurzzeitanalyse (6 Monate-Überleben), nicht jedoch in der Langzeitanalyse (12- bzw. 18-Monate-Überleben) (130). Eine mögliche Erklärung für die Prognoseverbesserung durch PD-L1-Expression ist, dass dieses Oberflächenmolekül durch lokale Entzündungsfaktoren (wie IFN- $\gamma$ ) in der Tumormikroumgebung induzierbar ist und seine

Expression damit eine aktive, endogene, antitumorale Immunantwort widerspiegeln könnte (151).

Weiterhin könnten die beschriebenen Diskrepanzen auf methodische Unterschiede zurückzuführen sein, wie z.B. die Verwendung unterschiedlicher Antikörper, verschiedener Cut-Off-Werte der PD-L1-Positivität, unterschiedlicher Scoring-Kriterien (unter Einbeziehung oder Ausschluss der Immunzellen) und den Einschluss von Patienten mit unterschiedlichem HPV-Status und verschiedenen Vorbehandlungen in eine einzige Studienkohorte. Ebenso unterscheiden viele Studien nicht die PD-L1-exprimierenden Zellarten (152). Je nachdem auf welchem Zelltyp der Oberflächenmarker exprimiert wird scheint dies Einfluss auf die prognostische Aussagekraft zu haben; eine hohe PD-L1-Expression auf Tumorzellen verkürzt das Überleben signifikant, während das Überleben von Patienten mit hohem PD-L1-Gehalt auf weiteren Zellen der Tumormikroumgebung signifikant länger ist als bei niedrigem PD-L1-Spiegel. Vor allem die Expression auf Immunzellen scheint hierbei einen positiv prognostischen Wert zu haben (33, 153). Der Mechanismus der gegensätzlichen Wirkung je nach exprimierender Zellart bleibt unklar (154). Demgegenüber steht jedoch, dass die PD-L1-Expression sowohl auf Tumor- als auch auf Immunzellen als positiv prognostischer Faktor dargestellt werden konnte (151).

Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der prognostischen Relevanz zeigen die hohe Komplexität und Heterogenität der Tumor-Stroma-Kommunikation und der Interaktionen zwischen der Tumor-PD-L1-Expression und den Immunzellen innerhalb der Tumormikroumgebung. Dies sind alles Hinweise darauf, dass einzelne Marker alleine keine prognostische Sicherheit geben können und nur die Zusammenschau mehrerer Prozesse zielführend sein kann.

Metaanalysen anderer Tumorentitäten, wie beispielsweise Mamma- und Ovarialkarzinome (155, 156), NSCLC (135, 157), Pankreaskarzinome (158), Nierenzellkarzinome (159), maligne Melanome (160) und Magenkarzinome (161) zeigten größtenteils bei PD-L1-Überexpression eine signifikant schlechtere Prognose und ein verkürztes Überleben. Es zeigte sich teilweise, dass das Gesamtüberleben (knapp) signifikant schlechter war, das DFS jedoch keine signifikante Änderung zeigte. Es war auch hier eine deutliche Heterogenität innerhalb der Ergebnisse der Metaanalysen zu verzeichnen. Studien, die PD-L1 als negativen Prognosefaktor belegen, waren stets begleitet von

anderen Studien, in denen kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression und dem Überleben hergestellt werden konnte.

Betrachtet man ausgewählte HNSCC (R/M HNSCC ohne Möglichkeit einer Lokaltherapie – Radiatio/Operation), wie beispielsweise in der SUPREME-HN-Studie, bestand unabhängig von der gewählten Standard-Chemotherapie kein signifikanter Überlebensunterschied zwischen hoher, geringer oder gar keiner PD-L1-Expression. Während Patienten mit PD-L1 exprimierenden Mundhöhlen- und Oropharynx-Tumoren eine kürzere Überlebenszeit aufwiesen als solche mit negativem PD-L1-Status, lebten Patienten mit PD-L1 positivem Hypopharynxkarzinom länger als PD-L1-negative. Diese Daten weisen darauf hin, dass PD-L1 je nach Lokalisation des Primärtumors sowohl positiv als auch negativ prognostisch sein kann (4).

Bei der Betrachtung des Gesamtüberlebens der Patienten darf hingegen auch die jeweilige angewandte Therapieoption nicht außer Acht gelassen werden, da diese das Überleben unabhängig beeinflussen kann. Da bei hoher PD-L1-Expression von einem besseren Ansprechen auf (Anti-PD-1-/PD-L1-)Immuntherapeutika auszugehen ist, kommt es bei diesen Patienten insgesamt auch zu einem verbessertem Gesamtüberleben. Hierbei ist vor allem das Kurzzeitüberleben (6 Monate) verbessert, nach 12 bzw. 18 Monaten konnte keine Verbesserung mehr nachgewiesen werden (1, 130). Bei anderen Tumoren, wie z.B. Melanomen und NSCLC kann man schon von PD-L1 als prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf bestimmte Immuntherapeutika sprechen (145).

#### 5.2.5 Überlebenszeit in Abhängigkeit von dem Immunzellinfiltrat

Zu erwarten ist, dass eine schlechtere Differenzierung der Tumorzellen, ebenso wie ein höheres TNM-Stadium und ein R1-Status, einen negativen Einfluss auf die Prognose haben (15, S.38, 162). In unserer Analyse zeigte sich analog ein signifikant schlechteres Überleben im UICC Stadium IVc verglichen zu den anderen UICC-Stadien und ein signifikant besseres Überleben im UICC Stadium I verglichen zu allen anderen Stadien.

Aber auch andere klinische und histopathologische Parameter scheinen einen prognostischen Wert zu haben. Seit einigen Jahren wird beispielsweise dem HPV-Status große Bedeutung als Prognosefaktor zugesprochen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das häufig beobachtete vermehrte Immunzellinfiltrat bei HPV-Positivität und die

damit einhergehende verstärkte Immunantwort auf das Tumorgeschehen (163-167). Patienten mit HPV-positiven Tumoren zeigen signifikant bessere Überlebensraten, auch wenn diese durch wiederum andere (immunsupprimierende) Faktoren, wie z.B. Tabakabusus erneut vermindert werden können (168). Die immunsupprimierende Eigenschaft von Tabak wurde auch in anderen Studien belegt, die eine geringere Anzahl an zytotoxischen T-Lymphozyten und anderen Immunzellen in der TME von aktiven Rauchern im Vergleich zu Nie-/Ex-Rauchern feststellen konnten. Der vermutlich für die Immunreaktion ebenso wichtige Faktor der HPV-Infektion wurde hierbei relativiert, da nur HPV-negative HNSCC betrachtet wurden (169). Diese in unserer Studie nicht erhobenen Faktoren könnten als Confounder bei der Analyse der Überlebensraten wirken.

Bis heute gilt das TNM-Stadium als wichtigster Prognosefaktor (17), auch wenn in der Vergangenheit schon häufig die Vorhersagekraft der klassischen TNM-Klassifikation in Frage gestellt wurde, da sie das immer relevanter werdende Netzwerk an immunaktiven Oberflächenmarkern und Immunzellen in der Umgebung des Tumorgewebes nicht berücksichtigt. Die TNM-Klassifikation kann nur begrenzte prognostische Informationen bereitstellen und lässt keine prädiktiven Aussagen bezüglich einer spezifischen Therapie zu (170). Somit trat die Wichtigkeit des „tumor microenvironment“ in der Entstehung und Entwicklung des Tumors in den Vordergrund (171). 1986 wurde bereits die Infiltration von Immunzellen in der Tumormikroumgebung als unabhängiger prognostischer Faktor dargestellt und stellte damit die Aussagekraft der klassischen TNM-Klassifikation in Frage (172, 173).

#### 5.2.5.1 T-Lymphozyten

Eine genauere immunhistochemische Untersuchung der unterschiedlichen Immunzellen der Tumorumgebung bei HNSCC-Patienten ergab, dass vor allem T-Lymphozyten dominant waren, es fanden sich nur vereinzelt B-Lymphozyten oder NK-Zellen (93). Zytotoxische T-Lymphozyten stehen im Mittelpunkt der Anti-Tumor-Immunität verschiedener Tumore. Bei HNSCC erkennen sie Tumorzellen und töten sie mittels Produktion von IFN- $\gamma$ , Perforin und Granzym ab (174).

Es fiel auf, dass die peritumorale Stromainfiltration deutlich stärker ausgeprägt war als die parenchymale Infiltration. Im Tumorparenchym dominieren zytotoxische T-Lymphozyten (CD8+), peritumoral fanden sich gleiche Anteile von CD4+- und CD8+- T-

Lymphozyten. Bei schlecht differenzierten Tumoren war die mittlere parenchymale Infiltration insgesamt höher als bei gut bis moderat differenzierten. Außerdem zeigte sich eine signifikant geringer ausgeprägte intratumorale T-Zell-Infiltration bei frühem Rezidivtumor bzw. kurzem Überleben. Die intratumorale T-Helferzell-Infiltration war mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben und auch krankheitsfreien Überleben assoziiert, wohingegen die stromale Infiltration keine signifikante Verbesserung des Überlebens brachte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass nur T-Lymphozyten im Inneren des Tumorgeschehens von Nutzen sind (93). Ähnliche Ergebnisse lieferten Zhu et al, bei denen eine niedrige Anzahl intratumoraler TIL mit einem schlechteren Gesamtüberleben und krankheitsfreien Überleben assoziiert war (91).

Auch bei unserer Studie waren T-Lymphozyten des erworbenen Immunsystems neben den NK-Zellen die meistvertretene Population. Die signifikante Korrelation einer geringen Infiltration mit T-Lymphozyten (CD3+) mit einem schlechteren Überleben unterstreicht die Wichtigkeit dieser Immunzellen bei der Tumorbekämpfung. Aufgrund der Prädominanz der T-Lymphozyten in HNSCC stellen sie auch den wichtigsten Ansatzpunkt für Immuntherapien dar (93).

Bei der Analyse der prognostischen Aussagekraft des Immunzellinfiltrates bei HNSCC gibt es ebenfalls eine große Heterogenität. Einer aktuellen Metaanalyse von Borsetto et al zufolge führen viele T-Lymphozyten (CD4+ und CD8+ TIL) in der Tumorumgebung zu einer signifikanten Reduktion des Sterberisikos. Hierbei wurde sowohl das Gesamtüberleben als auch das krankheitsfreie Überleben verbessert (175). Diese Beobachtungen waren aber teilweise auch abhängig von der Lokalisation des Tumors: wohingegen sowohl T-Helferzellen als auch zytotoxische T-Zellen bei oropharyngealen Tumoren zu einem verbessertem OS führten, waren für die Prognose bei hypopharyngealen Tumoren nur CD8+ TIL entscheidend; für Mundhöhlen- und Larynxkarzinome konnten keine signifikanten Zusammenhänge dargestellt werden (175). Nordfors et al und andere Autoren zeigten ebenso für zytotoxische TIL bei hoher Infiltration ein verbessertes (3-Jahres-) Überleben (4, 176).

Auch ältere Metaanalysen zeigten ähnliche Ergebnisse für die T-Lymphozyten-Marker (83, 177); hierbei bleibt die Relevanz von T-Helferzellen am häufigsten strittig, da viele verschiedene CD4-positive T-Helferzell-Subgruppen mit unterschiedlichen Funktionen existieren (177). Diese können sowohl pro- als auch antitumorale Eigenschaften aufweisen: Th1-Zellen fördern die Anti-Tumor-Immunantwort, indem sie zytotoxische T-

Zellen stimulieren, aber auch Th2-Zellen sind mit der Anti-Tumor-Immunität verbunden. Andererseits wird angenommen, dass CD4+ regulatorische T-Zellen eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort hemmen (178).

Einige Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen T-Zell-Markern (CD3/-4/-8) und dem Gesamt- bzw. krankheitsfreien Überleben bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich nachweisen (56, 129). Teilweise waren die Patienten aber bereits mit einer Radiochemotherapie vorbehandelt, was eventuell zu einer Veränderung der Tumormikroumgebung geführt hat oder es wurden nur HPV-negative und somit generell immunschwächere Tumore eingeschlossen. Außerdem macht es auch hier einen Unterschied, ob man intratumorale oder stromale Zellen untersucht (56, 179). Oguejiofor et al zeigten in einer multivariaten Analyse, dass eine hohe Dichte von CD8+-T-Zellen im Tumorstroma, nicht aber im Tumorparenchym, mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben assoziiert war (180). Nguyen et al beobachteten hingegen, dass tumorparenchymale CD4+- und CD8+-Lymphozyten prognostisch relevant sind (181).

Auch bei anderen Tumorarten wurden etliche Analysen der Tumormikroumgebung durchgeführt, bei denen die prognostische Aussagekraft von Immunzellen untersucht wurde. Beim NSCLC, sowie Ösophagus-, Colon- und Mammakarzinom gelten (intratumorale) zytotoxische T-Lymphozyten als positiver prognostischer Faktor (182-185). Analysen bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zeigten - abgesehen von einer positiven Aussagekraft von CD8-positiven Lymphozyten - auch für T-Helferzellen einen Zusammenhang zwischen der Infiltration und einem verbesserten Überleben. Sind sowohl CD4- als auch CD8-positiv T-Lymphozyten gleichzeitig vermehrt präsent, ist mit noch einer deutlicheren Verbesserung des Überlebens zu rechnen. Diese Beobachtungen unterstreichen die direkte lysierende Funktion der zytotoxischen T-Lymphozyten und die Anlockung von Effektorzellen mittels sezernierter Zytokine (z.B. IFN) der T-Helferzellen (186, 187).

Analysen anderer Tumormikroumgebungen (beispielsweise bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen) zeigten, dass eine hohe Anzahl weiterer Immunzellen, wie tumorinfiltrierender B-Zellen und PD-1-positiver Zellen signifikant mit einem verlängerten krankheitsspezifischen Überleben assoziiert war und zytotoxische T-Lymphozyten und eine hohe PD-L1-Expression mit einer Verschlechterung des Überlebens einhergehen. Somit konnten einige Untergruppen tumorinfiltrierender Leukozyten (B-Zellen,

zytotoxische T-Zellen) sowie die PD-L1-Expression als unabhängige prognostische Biomarker für das Überleben identifiziert werden (99). Aufgrund ihrer T-Zell-unterstützenden und zytotoxischen Funktion waren B-Lymphozyten als tumorinfiltrierende Lymphozyten bei mehreren Tumoren mit einer besseren Prognose assoziiert (74).

#### 5.2.5.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen wirken als Teil des angeborenen Immunsystems unspezifisch MHC-unabhängig zytolytisch gegen Tumorzellen. NK-Zellen scheinen aber nicht nur als Komponente der angeborenen Immunität zu fungieren, sondern es gibt auch Hinweise darauf, dass sie bei der adaptiven Immunantwort über die Sekretion von IFN- $\gamma$  und der damit verbundenen Aktivierung anderer Immunzellen eine wichtige Rolle spielen (188).

Es wurde bei unterschiedlichen Tumoren der Einfluss von NK-Zellen auf das Überleben analysiert: in einer Magenkarzinom-Studie von Ishigami et al stellte sich CD56 in der multivariaten Analyse nicht als signifikanter Prognosemarker dar. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass jedoch die kombinierte Betrachtung mit der lymphozytären Infiltration Hinweise auf die Prognose geben könnte (189). Beim kolorektalen Karzinom war eine starke intratumorale Infiltration mit NK-Zellen mit einer besseren Prognose assoziiert (190). Auch für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches gibt es eine Metaanalyse von Bisheshar et al aus dem Jahr 2020, die insgesamt von einem besseren Gesamtüberleben bei hoher Infiltration der Tumormikroumgebung mit CD56+-NK-Zellen berichtet; nur eine einzige Studie zeigte keine signifikante Korrelation (83, 191). Dies ist möglicherweise auf eine generell gering ausfallende Infiltration mit NK-Zellen bei einzelnen Tumoren zurückzuführen (186).

#### 5.2.5.3 Makrophagen

Die Funktion der Makrophagen bei Tumorerkrankungen ist vielfältig. Einerseits fördert ein Teil der Makrophagen (M2-Polarisation) die Tumorangiogenese, -progression und -metastasierung (antiinflammatorisch, protumoral) durch Sezernierung von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$  (174, 192), andererseits wirken einige M1-polarisierte Makrophagen proinflammatorisch und somit antitumoral (124).

Eine Metaanalyse von Troiano et al und kleinere Studien, in denen CD68 als prognostischer Marker bei HNSCC untersucht wurde, zeigten keine eindeutige Korrelation

zwischen tumorassoziierten Makrophagen und dem Gesamtüberleben bzw. krankheitsfreien Überleben (125, 193). Der auch in unserer Untersuchung verwendete Oberflächenmarker CD68 ist ein Pan-Makrophagen-Marker und lässt keine Unterscheidung hinsichtlich der Polarisation zu. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden konnten. CD163 als M2-Makrophagen-Marker sagt beispielsweise bei starker Infiltration eine schlechtere Prognose voraus (83, 193). Das gelegentlich verbesserte Überleben bei hoher Infiltration von Makrophagen an der Tumordinvasionsfront könnte dadurch erklärt werden, dass vor allem M1-polarisierte Makrophagen mit zytotoxischer Funktion detektiert wurden, die zur Tumorregression führen (194).

Möglicherweise kann der Nachweis von CD68 in Zusammenhang mit anderen Faktoren, wie beispielsweise dem Vorhandensein von VEGF oder der Lokalisation der Makrophagen innerhalb der Tumormikroumgebung eine prognostische Rolle spielen (195). So zeigten Seminerio et al, dass vor allem der intratumorale Nachweis (im Gegensatz zum stromalen Vorkommen) von CD68+-Makrophagen eine negativ prognostische Rolle spielt (129, 196). Andere Studien zeigten jedoch ein kürzeres Überleben bei stromaler Infiltration mit CD68-Makrophagen bei OSCC (197).

#### 5.2.5.4 PD-1-exprimierende Immunzellen

Erwartungsgemäß zeigte sich auch zwischen der Expression des PD-1-Rezeptors auf Immunzellen und dem Outcome der Patienten kein eindeutiger Zusammenhang. Durch die extrem heterogenen Ergebnisse der Aussagekraft der zugehörigen Liganden, ist auch die Relevanz des Rezeptors strittig. Dadurch dass die PD-1-Expression auf T-Lymphozyten eine inhibitorische Funktion gegen Effektor-T-Zellen ausübt (198) und beobachtet wurde, dass PD-1 vor allem auf bereits aktivierten und teilweise auch schon erschöpften T-Lymphozyten hochreguliert wird, deutet dies auf eine negativ prognostische Bedeutung der PD-1-Expression hin (139). Auch wenn PD-1 zumeist von T-Lymphozyten exprimiert wird, wurde dieser Oberflächenmarker auch auf anderen Immunzellen nachgewiesen. Dies passt zu Ergebnissen, die einen Zusammenhang zwischen einer dichten Infiltration von PD-1-positiven Zellen in der Tumorumgebung und einem besseren Überleben vermutlich durch die generell stärkere antitumorale Immunreaktion herstellen konnten (128, 129).

### 5.2.6 Überlebenszeit in Abhängigkeit von der PD-L2-Expression

Der Einfluss der PD-L2-Expression auf die Prognose und das Therapieansprechen ist deutlich weniger gut erforscht als der des PD-L1-Liganden.

Studien anderer Tumore, wie beispielsweise Mamma- oder Pankreaskarzinomen, konnten keinen Zusammenhang zwischen der PD-L2-Expression und dem Überleben herstellen (199, 200). Auch für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich scheint PD-L2 alleine keine prognostische Relevanz zu haben (131, 136, 138). Betrachtet man PD-L2 in Zusammenhang mit anderen Faktoren, zeigte sich beispielweise für HPV-negative HNSCC Patienten bei hoher PD-L2-Expression ein schlechteres Überleben (201). Eine andere Studie zeigte, dass die mittels Immunhistochemie nachgewiesene PD-L2-Expression einen additiven Wert gegenüber dem PD-L1-Status allein bei der Vorhersage des Ansprechens auf Anti-PD-1-Immuntherapien hat. Hierbei war jedoch die PD-L2-Expression signifikant mit der PD-L1-Expression assoziiert, was die Aussagekraft der beiden Marker getrennt voneinander schwer beurteilen lässt (109).

Zhou et al. haben kürzlich einen immunbasierten prognostischen Score entwickelt, der sieben Merkmale (wie z.B. die CD3- und CD8-Expression) kombiniert, die eine signifikante klinische Relevanz für das Überleben nach kurativer Resektion haben. Neben anderen Immunmarkern deutet vor allem das vermehrte Vorhandensein intratumoraler CD3+-Zellen und zytotoxischer T-Lymphozyten auf eine bessere Prognose der Patienten hin. Durch die Kombination mehrerer relevanter Biomarker nähert man sich der komplexen Gesamtheit der Immunprozesse bei Tumorgeschehen immer genauer an und ermöglicht in Kombination mit der klassischen TNM-Klassifikation eine bessere Einschätzung. Immunoscores können beispielsweise genutzt werden, um die Ansprechbarkeit auf Immuntherapien sowie die erwartete Prognose einzuschätzen und Patienten somit einer bestmöglichen Therapie zuzuführen (125). Durch genaue softwarebasierte Berechnungen wurden die untersuchten Patienten in dichotome Gruppen eingeteilt (niedrige/hohe Expression des jeweiligen Markers). Da wir bei unseren Untersuchungen vier Quartile der Immunzellmarker-Expression bei der Untersuchung der prognostischen Relevanz des Immunzellinfiltrats verwendeten, sind signifikante Ergebnisse seltener zu erwarten als nach genauer Berechnung des optimalen Cut-Off-Wertes mittels einer Software.

Die Expression der programmierten Zelltod-Liganden 1 und 2 (PD-L1/PD-L2) auf Tumorzellen und die Interaktion mit ihrem Rezeptor (PD-1) auf tumorspezifischen T-

Zellen, die die Antitumoraktivität begrenzen, sind nur ein Mechanismus, um der Immunantwort des Wirts zu entgehen. Es gibt auch noch weitere Mechanismen für die Resistenz solider Tumore gegenüber der Immunerkennung, beispielsweise die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen, myeloiden Suppressorzellen und die lokale Sekretion von inhibitorischen Zytokinen (202).

## 6 Zusammenfassung

Die trotz ständiger medizinischer Fortschritte weiterhin schlechte Prognose von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich macht es notwendig, die Ursachen hierfür genauer zu untersuchen und möglicherweise immunsuppressive Eigenschaften des Tumors therapeutisch zu nutzen. Viele maligne Tumore haben Mechanismen entwickelt, um der Immunabwehr des Wirtsorganismus zu entkommen; dies geschieht beispielsweise mittels Expression von Oberflächenproteinen auf Tumorzellen, die über eine Schwächung der T-Zell-Aktivität zu einer Tumorprogression führt. Somit steht die Erforschung von molekularpathologisch bestimmbar Biomarkern als prognostische Parameter bzw. als Behandlungsansatz bei Tumorerkrankungen im Fokus aktueller Untersuchungen.

Immuncheckpoint-Inhibitoren (Anti-PD-1-/PD-L1-Antikörper) sind bisher beim HNSCC nur als Zweitlinientherapie empfohlen, obwohl mit ihnen in einigen Fällen signifikant verbesserte Ansprech- bzw. Überlebensraten, vor allem bei verstärkter Tumor-Immunogenität, sowie PD-L1- und HPV-Positivität, erzielt werden konnten. Da funktionsfähige Immunzellen in der Tumormikroumgebung zu einem verbesserten Ansprechen auf eine Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren führen, wäre es in Zukunft denkbar, multimodale Kombinationen einer Immuncheckpointblockade mit immunstimulatorischen Substanzen oder Therapien zu etablieren. So könnten zum Beispiel die immunsystemstimulierenden Eigenschaften der First-Line-Radiochemotherapie genutzt werden und in ausgewählten Fällen durch eine Immuncheckpoint-Blockade ergänzt werden. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die direkte Stärkung der T-Zell-Aktivität, was unabhängig vom PD-L1-Status zu einer Verbesserung der Tumorabwehr und somit zu einer besseren Prognose führen sollte.

In dieser Studie wurde mittels Immunhistochemie die Immunogenität ausgewählter HNSCC und die Expression einer Auswahl potentiell relevanter prognostischer bzw. prädiktiver Biomarker an 137 HNSCC-Patienten der Universitätsmedizin Mainz in einem 6-jährigen Erhebungszeitraum untersucht. Es zeigte sich eine signifikant höhere Expression des immunsuppressiven Oberflächenmarkers PD-L1 beim männlichen Geschlecht. Alle weiteren klinischen Parameter (Patientenalter, Tumorlokalisierung, TNM-/UICC-Klassifikation, Grading und Noxenabusus) zeigten keine Zusammenhänge zum PD-L1-Status. PD-L1-exprimierende Tumore wiesen insgesamt eine signifikant höhere Infiltration mit zytotoxischen T-Lymphozyten und PD-1-exprimierenden Zellen

auf, was als Reaktion des Tumors auf die laufende Immunreaktion des Wirts interpretiert werden kann. Hiermit einhergehend ist die Verkürzung des Langzeitüberlebens bei niedriger PD-L1-Expression und somit geringer Infiltration mit CD3-exprimierenden T-Lymphozyten, durch eine vermutlich geringer ausfallende Antitumor-Immunreaktion und somit schnellere Progression bzw. Metastasierung des Tumors. Auf das Infiltrat mit weiteren Immunzellen (T-Helferzellen, Natürliche Killerzellen, und Makrophagen) scheint die Expression von PD-L1 keinen relevanten Einfluss zu haben. Auch wurde das Überleben durch die Infiltration mit T-Helferzellen, NK-Zellen und Makrophagen nicht signifikant beeinflusst.

Durch die Kombination mehrerer Biomarker nähert man sich der komplexen Gesamtheit der Immunprozesse bei Tumorgeschehen immer genauer an und ermöglicht in Kombination mit der klassischen TNM-Klassifikation eine bessere prognostische Einschätzung (203). Außerdem wäre es erstrebenswert, Patienten, die sich für eine Immuntherapie eignen, vor Therapiebeginn genauer selektieren zu können, um die Ansprechbarkeit zu erhöhen und Nebenwirkungen zu reduzieren.

Es wurde bereits bei verschiedenen Krebsarten mittels eines Immunoscores versucht, die komplexen Interaktionen im „tumor microenvironment“ abzubilden. Hierbei werden verschiedene (molekulare) Tumoreigenschaften kombiniert, um den Patienten der optimalen individuellen Therapie zuzuführen und eine prognostische Aussage treffen zu können (125, 204). Auch wenn die digitale Bildanalyse (noch) limitierende Faktoren aufweist, ist sie für die gleichzeitige Auswertung mehrerer molekularpathologischer Marker eine sinnvolle Alternative, die eine objektive Analyse unter Einsparung von Ressourcen ermöglicht.

In Zukunft werden weiterführende größere prospektive Studien benötigt, die verschiedene immunhistochemische Marker in Kombination mit klinischen Aspekten untersuchen und gleichzeitig Immuntherapeutika-Therapieregimes beinhalten, um auch eine Aussage über das Therapieansprechen machen zu können. Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit wären ebenso einheitliche Cut-Off-Werte für die Definition der PD-L1-Positivität wünschenswert.

## Anhang

### Versuchsprotokoll immunhistochemische PD-L1-Färbung

1. Entparaffinieren: Die auf Objektträger aufgetragenen in Paraffin gebetteten Tumorschnitte 20 Minuten bei 66 °C im Wärmeschrank lagern und das verflüssigte Paraffin ablaufen lassen
2. Rehydratisieren: Objektträger für 15 min in Xylol gegeben (hierbei wird das restliche Paraffin gelöst), anschließend wird das wasserunlösliche Xylol in einer absteigenden Alkoholreihe (3 min in 99%igen Ethanol, gefolgt von jeweils 2 Minuten in 96%iger und 70%iger Ethanollösung) aus dem Gewebe gewaschen
3. Spülen in Aqua dest.
4. Herstellen der pH-Lösung: Target Retrieval Solution (50-fach konzentriert) 1:50 verdünnen. Bei TRS low-pH 8ml TRS mit 242ml Aqua dest. Auf 250ml verdünnen), bei TRS high pH 5ml TRS mit 245ml Aqua dest. Auf 250ml verdünnen)
5. Vorbehandlung in pH-Lösung zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung (je nach Vorgabe des Primär-AK): die Tumorschnitte im vorgeheizten Low-pH-Puffer (pH 6,1 – für PD-L1, PD-L2 und PD1) im Dampfgarer 35 min kochen  
Für die CD-Färbungen wurden die Schnitte in high-pH-Puffer (pH 9) für 20 Minuten gekocht (95-99 °C)
6. Abkühlen: Küvetten mittels Wärmekonvektion ca. 7 Minuten unter fließendem Leitungswasser auf Raumtemperatur bringen
7. Schnitte für 4 min in 1:20 mit Aqua dest. verdünntem Wasch-Puffer stellen, um die Oberflächenspannung des Leitungswassers aufzulösen
8. Objektträger in die Fächer des Färbeautomaten stellen, etwas Wasch-Puffer über die Schnitte geben
9. Automatisierte Färbung der Schnitte: Autostainer mit dem programmierten Protokoll starten  
Hierbei wird der Tumorschnitt nach Blockierung der endogenen Peroxidase zum Vermeiden falsch positiver Färbungen, zuerst mit dem (ggf. mit Diluent verdünnten) Primär-AK (bei PD-Färbungen 30 min, bei CD-Färbungen 20 min), dann mit dem Sekundär-AK (Rabbit-/Mouse-LINKER) inkubiert und im Anschluss dann der gebundene Komplex mittels Tertiär-AK (HRP) und Chromogen DAB+ sichtbar gemacht.

Es konnten nach Befüllen der vorgegebenen Fächer des Autostainers somit alle acht immunhistochemischen Färbungen ohne Unterbrechung automatisch nach einmaligem Programmieren nacheinander automatisiert ablaufen.

Das Präparat wird zum Schluss des Programmes noch mittels HE-Färbung gegengefärbt

10. HE-Färbung bläuen: nach Beenden des Laufes Schnitte 3 Minuten in Leitungswasser tauchen
11. Haltbarmachen der gefärbten Schnitte: in einer aufsteigenden Alkoholreihe Schnitte dehydratisieren und abschließend in Xylol geben
12. Eindecken: Zum Schutz der Schnitte Objektträger mittels Entellan mit einem Deckgläschen versehen
13. Digitalisieren: Objektträger mit einem Scanner (Nano Zoomer) einscannen. Es wurde mit 20-facher Vergrößerung und vollautomatischem Modus gearbeitet

Das immunhistochemische Färbeergebnis zeigt:

- Zellkerne: blau
- Zytoplasma und Bindegewebe: grau bis hellblau
- Antikörper-induzierte Epitope: braun

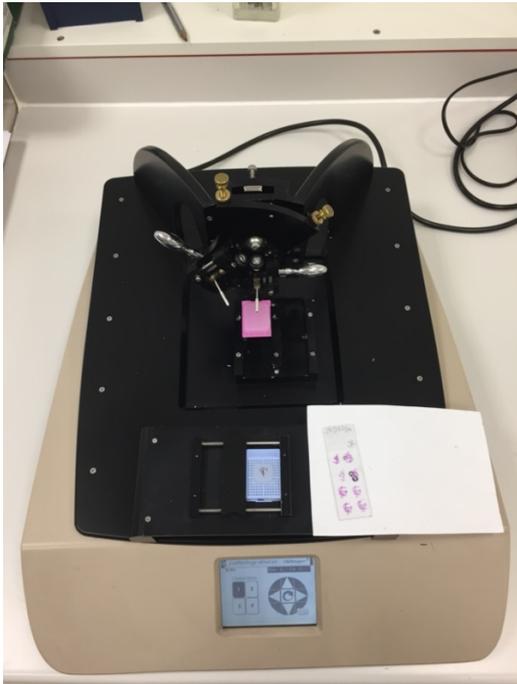
Bilder

Abbildung 28: TMArrayer 1

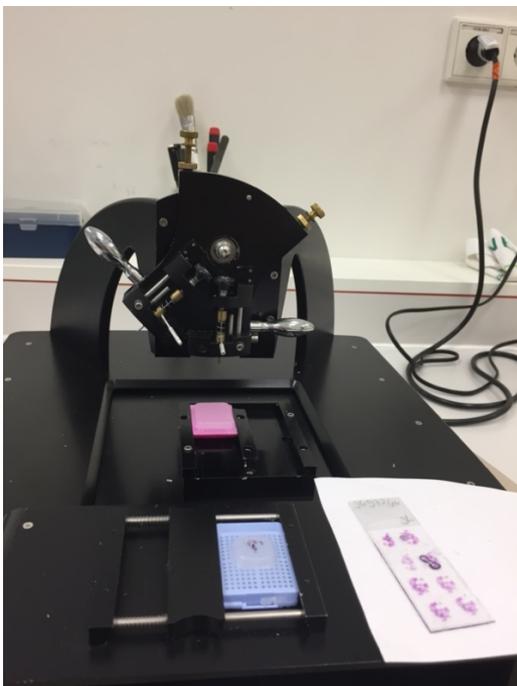


Abbildung 29: TMArrayer 2

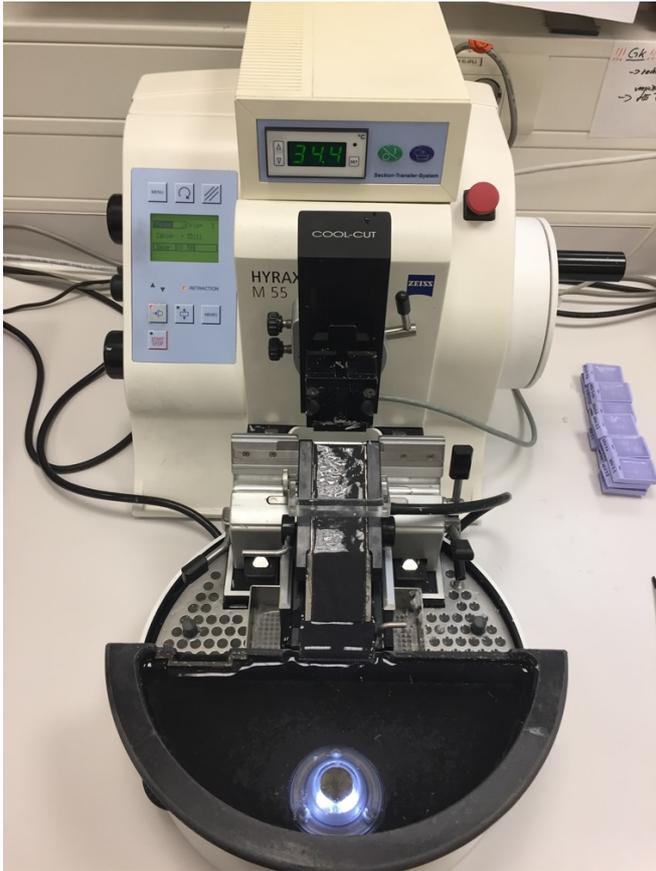


Abbildung 30: Rotationsmikrotom

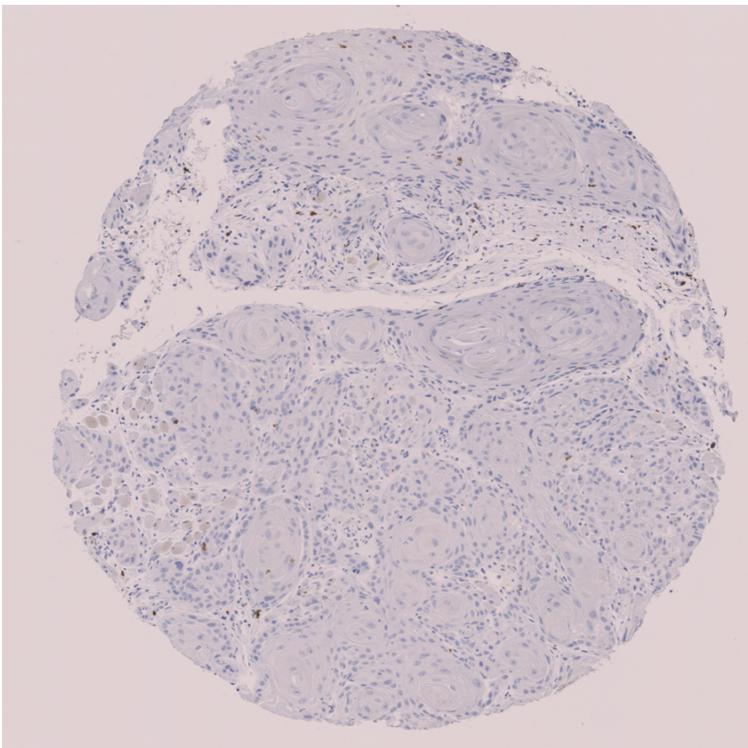


Abbildung 31: Beispiel-Core mit geringer Anzahl CD8-positiver Zellen

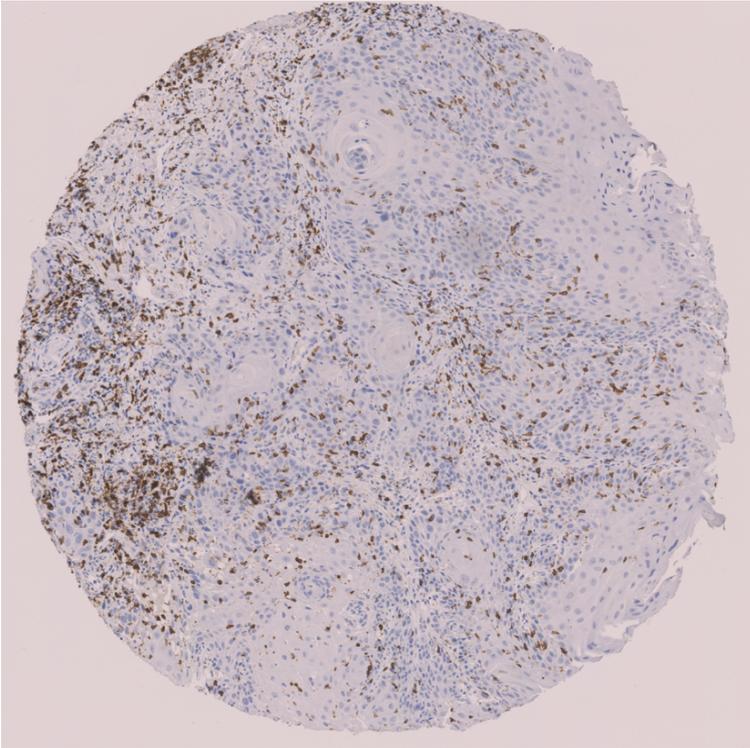


Abbildung 32: Beispiel-Core mit mittlerer Anzahl CD8-positiver Zellen

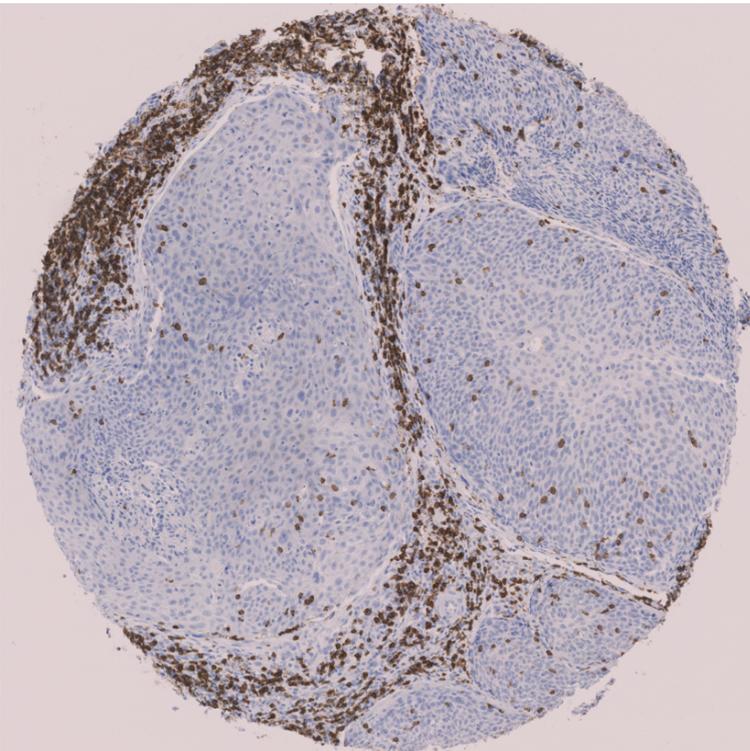


Abbildung 33: Beispiel-Core mit hoher Anzahl CD8-positiver Zellen

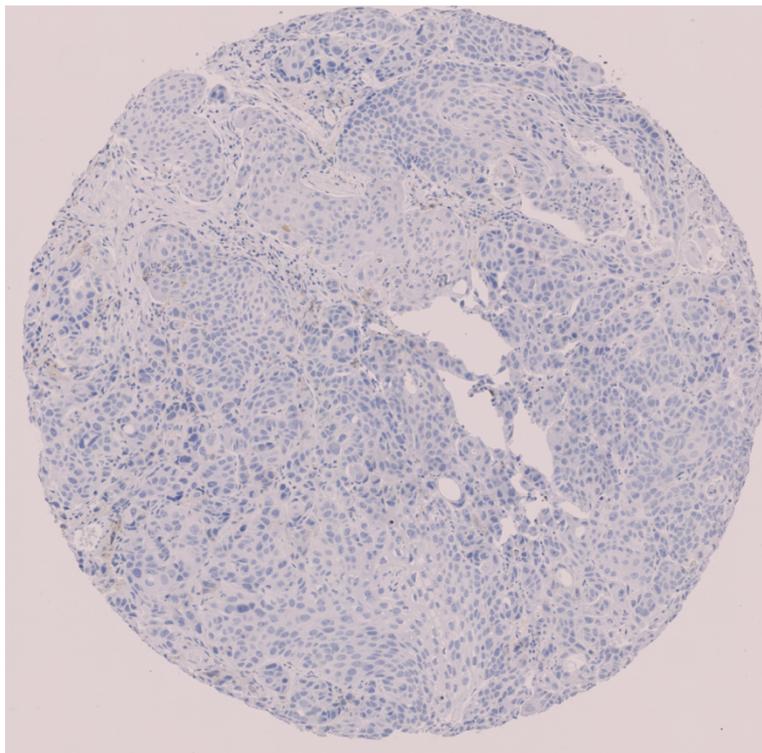


Abbildung 34: Beispiel-Core mit geringer PD-L1-Expression

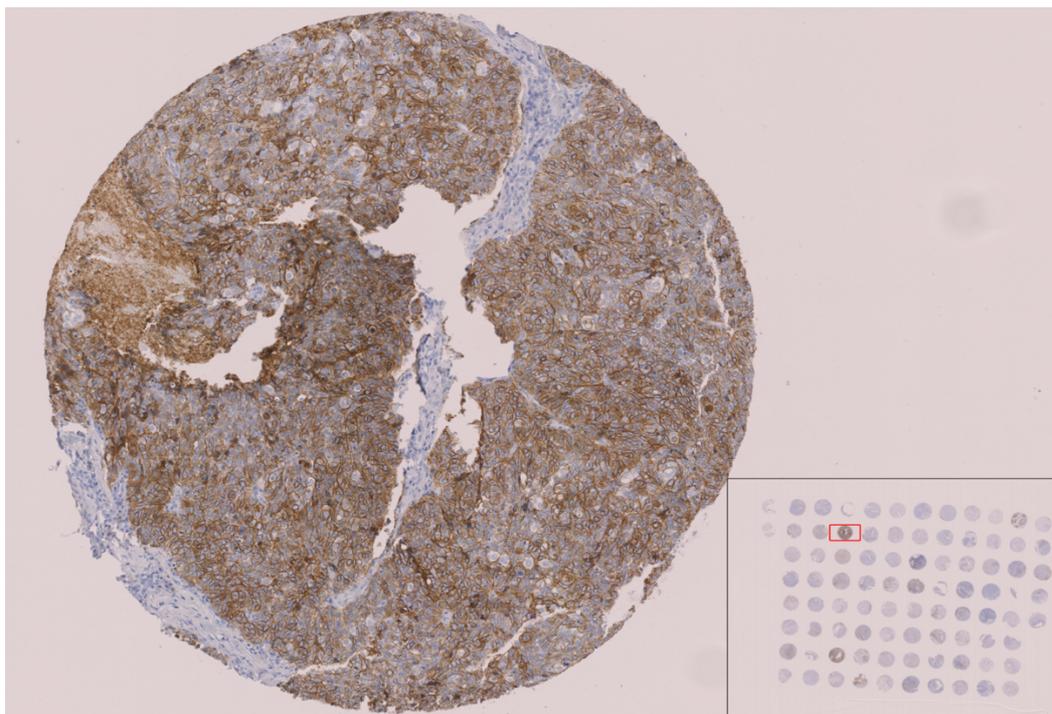


Abbildung 35: Beispiel-Core mit hoher PD-L1-Expression

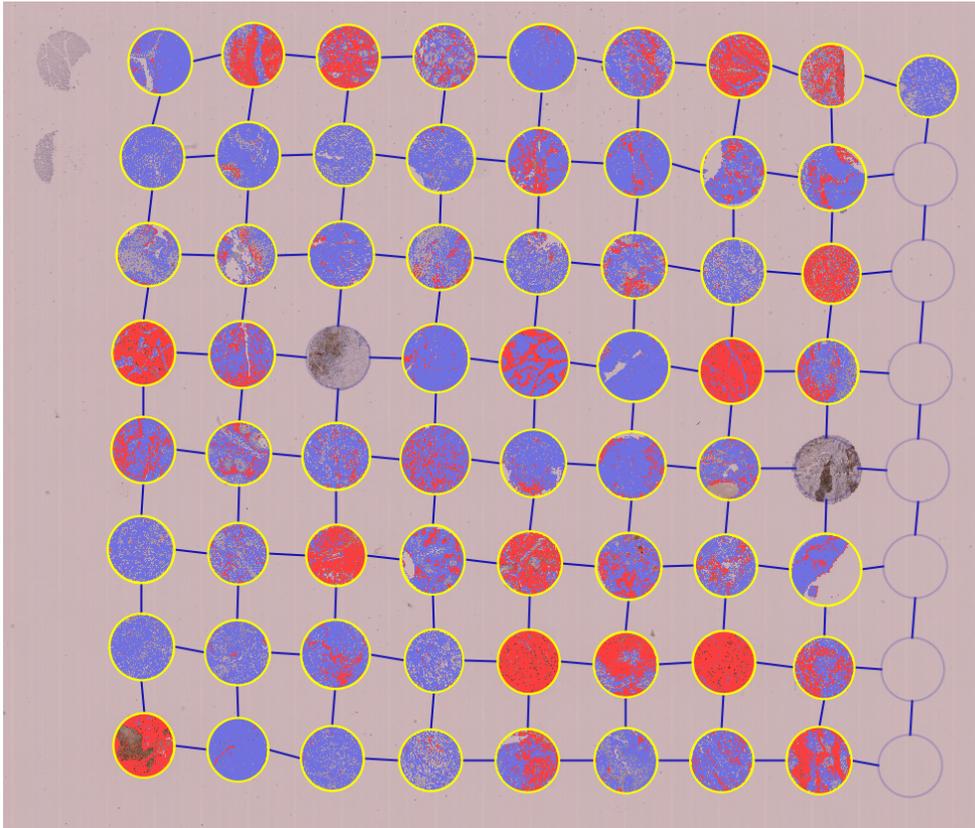


Abbildung 36: QuPath-Auswertung PD-L1 positiver/negativer Zellen (positiv-rot, negativ-blau)

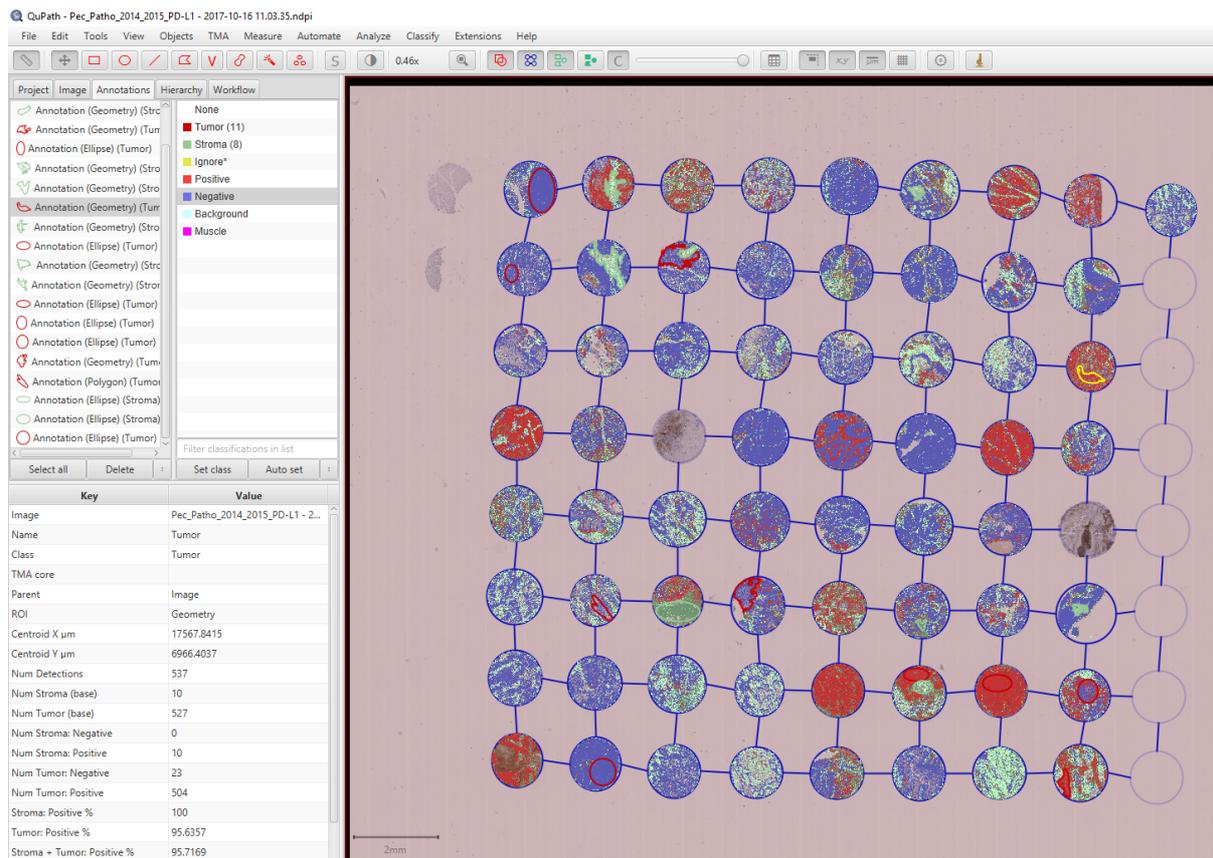


Abbildung 37: QuPath-Auswertung PD-L1 komplett

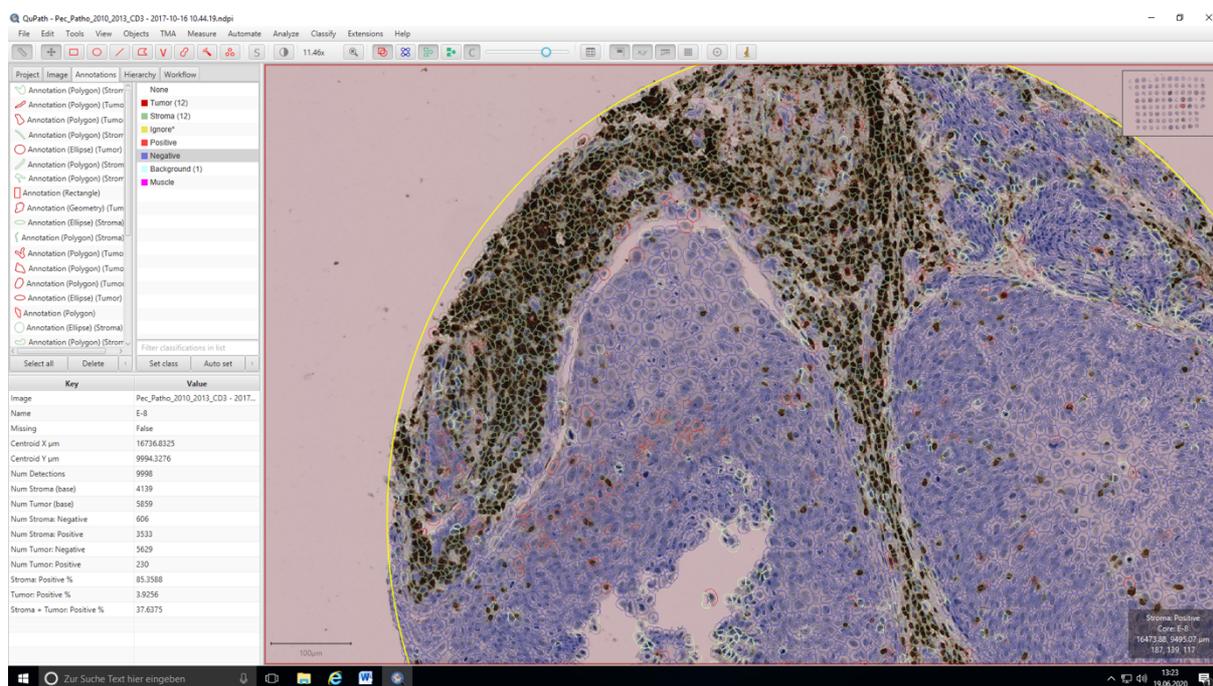


Abbildung 38: QuPath-Auswertung CD3



## Literaturverzeichnis

1. Galvis MM, Borges GA, Oliveira TB, Toledo IP, Castilho RM, Guerra ENS, et al. Immunotherapy improves efficacy and safety of patients with HPV positive and negative head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;150:102966.
2. Subramaniam SS, Paterson C, McCaul JA. Immunotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2019;57(10):957-66.
3. Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2004;108(5):741-9.
4. Pai SI, Cohen EEW, Lin D, Fountzilas G, Kim ES, Mehlhorn H, et al. SUPREME-HN: a retrospective biomarker study assessing the prognostic value of PD-L1 expression in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Transl Med*. 2019;17(1):429.
5. 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.
6. Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459-544.
7. Menon S, Shin S, Dy G. Advances in Cancer Immunotherapy in Solid Tumors. *Cancers (Basel)*. 2016;8(12).
8. Ghanizada M, Jakobsen KK, Gronhoj C, von Buchwald C. The effects of checkpoint inhibition on head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral Oncol*. 2019;90:67-73.
9. Ran X, Yang K. Inhibitors of the PD-1/PD-L1 axis for the treatment of head and neck cancer: current status and future perspectives. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:2007-14.
10. Cristina V, Herrera-Gomez RG, Szturz P, Espeli V, Siano M. Immunotherapies and Future Combination Strategies for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21).
11. Dogan V, Rieckmann T, Munscher A, Busch CJ. Current studies of immunotherapy in head and neck cancer. *Clin Otolaryngol*. 2018;43(1):13-21.
12. Ferrata M, Schad A, Zimmer S, Musholt TJ, Bahr K, Kuenzel J, et al. PD-L1 Expression and Immune Cell Infiltration in Gastroenteropancreatic (GEP) and Non-GEP Neuroendocrine Neoplasms With High Proliferative Activity. *Front Oncol*. 2019;9:343.
13. Hirata-Nozaki Y, Ohkuri T, Ohara K, Kumai T, Nagata M, Harabuchi S, et al. PD-L1-specific helper T-cells exhibit effective antitumor responses: new strategy of cancer immunotherapy targeting PD-L1 in head and neck squamous cell carcinoma. *J Transl Med*. 2019;17(1):207.
14. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2014;26(2):123-41.
15. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft (DKG) DKD, AWMF). S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.01. 2019.

16. Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J Can Dent Assoc.* 2007;73(4):339-44.
17. (Hrsg.) ACTMPRPJS, von H, Remmele GKpHHKW. Pathologie - Kopf-Hals-Region, Weichgewebstumoren, Haut. Springer Verlag. 2009.
18. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg); Berlin 2019.
19. Mei Z, Huang J, Qiao B, Lam AK. Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):16.
20. Global Burden of Disease Cancer C, Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2019.
21. Global Burden of Disease Cancer C, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2017;3(4):524-48.
22. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016;91(3):386-96.
23. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut; 2016.
24. Lop J, Valero C, García J, Quer M, Ganly I, Shah JP, et al. Does age influence disease-specific survival in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck? *J Surg Oncol.* 2020;121(7):1058-66.
25. Du E, Mazul AL, Farquhar D, Brennan P, Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, et al. Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *Laryngoscope.* 2019;129(11):2506-13.
26. Saleh K, Eid R, Haddad FG, Khalife-Saleh N, Kourie HR. New developments in the management of head and neck cancer - impact of pembrolizumab. *Ther Clin Risk Manag.* 2018;14:295-303.
27. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008;371(9625):1695-709.
28. 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.
29. Elwood JM, Pearson JC, Skippen DH, Jackson SM. Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *Int J Cancer.* 1984;34(5):603-12.
30. 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. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2020;146(7):1677-92.
31. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007;98(10):1505-11.

32. Castellsague X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quiros B, Tous S, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(6):djv403.
33. Sato F, Ono T, Kawahara A, Kawaguchi T, Tanaka H, Shimamatsu K, et al. Prognostic impact of p16 and PD-L1 expression in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma receiving a definitive treatment. *J Clin Pathol.* 2019;72(8):542-9.
34. Chen SW, Li SH, Shi DB, Jiang WM, Song M, Yang AK, et al. Expression of PD-1/PD-L1 in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Int J Biol Markers.* 2019;34(4):398-405.
35. Schoenfeld JD, Gjini E, Rodig SJ, Tishler RB, Rawal B, Catalano PJ, et al. Evaluating the PD-1 Axis and Immune Effector Cell Infiltration in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2018;102(1):137-45.
36. Bosetti C, Gallus S, Trichopoulou A, Talamini R, Franceschi S, Negri E, et al. Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(10):1091-4.
37. Bosetti C, Talamini R, Levi F, Negri E, Franceschi S, Airoldi L, et al. Fried foods: a risk factor for laryngeal cancer? *Br J Cancer.* 2002;87(11):1230-3.
38. Hayes RB, Ahn J, Fan X, Peters BA, Ma Y, Yang L, et al. Association of Oral Microbiome With Risk for Incident Head and Neck Squamous Cell Cancer. *JAMA Oncol.* 2018;4(3):358-65.
39. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(5):269-82.
40. Ali J, Sabiha B, Jan HU, Haider SA, Khan AA, Ali SS. Genetic etiology of oral cancer. *Oral Oncol.* 2017;70:23-8.
41. Sato H, Uzawa N, Takahashi K-I, Myo K, Ohyama Y, Amagasa T. Prognostic utility of chromosomal instability detected by fluorescence in situ hybridization in fine-needle aspirates from oral squamous cell carcinomas. *BMC Cancer.* 2010;10(1):182.
42. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(11):1143-54.
43. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2006;354(6):567-78.
44. Kitamura N, Sento S, Yoshizawa Y, Sasabe E, Kudo Y, Yamamoto T. Current Trends and Future Prospects of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1).
45. Vermorcken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, et al. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(11):1116-27.
46. von der Grün J, Rödel F, Brandts C, Fokas E, Guckenberger M, Rödel C, et al. Targeted Therapies and Immune-Checkpoint Inhibition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Where Do We Stand Today and Where to Go? *Cancers (Basel).* 2019;11(4).
47. Kao HF, Lou PJ. Immune checkpoint inhibitors for head and neck squamous cell carcinoma: Current landscape and future directions. *Head Neck.* 2019;41 Suppl 1:4-18.
48. Strome AL, Zhang X, Strome SE. The evolving role of immuno-oncology for the treatment of head and neck cancer. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2019;4(1):62-9.

49. Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(29):3293-304.
50. Lei Y, Xie Y, Tan YS, Prince ME, Moyer JS, Nor J, et al. Telltale tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in oral, head & neck cancer. *Oral Oncol.* 2016;61:159-65.
51. Brix N, Dunn L, Seiwert T, Belka C, Lauber K. [Immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma : Abscopal effects in combination with radiotherapy, extraordinary responses in combination with chemotherapy, and pseudoprogression]. *Internist (Berl).* 2020;61(7):682-9.
52. Elbers JBW, Al-Mamgani A, Tesseslaar MET, van den Brekel MWM, Lange CAH, van der Wal JE, et al. Immuno-radiotherapy with cetuximab and avelumab for advanced stage head and neck squamous cell carcinoma: Results from a phase-I trial. *Radiother Oncol.* 2020;142:79-84.
53. Gillison ML, Trotti AM, Harris J, Eisbruch A, Harari PM, Adelstein DJ, et al. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet.* 2019;393(10166):40-50.
54. Moskovitz J, Moy J, Ferris RL. Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Curr Oncol Rep.* 2018;20(2):22.
55. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol.* 2017;8:561.
56. de Ruyter EJ, de Roest RH, Brakenhoff RH, Leemans CR, de Bree R, Terhaard CHJ, et al. Digital pathology-aided assessment of tumor-infiltrating T lymphocytes in advanced stage, HPV-negative head and neck tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 2020.
57. Kang J, Demaria S, Formenti S. Current clinical trials testing the combination of immunotherapy with radiotherapy. *J Immunother Cancer.* 2016;4:51.
58. Ohtsukasa S, Okabe S, Yamashita H, Iwai T, Sugihara K. Increased expression of CEA and MHC class I in colorectal cancer cell lines exposed to chemotherapy drugs. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129(12):719-26.
59. Sudo S, Kajiya H, Okano S, Sasaki M, Katsumata Y, Ohno J, et al. Cisplatin-induced programmed cell death ligand-2 expression associates with metastasis ability in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2020.
60. Saleh K, Daste A, Martin N, Pons-Tostivint E, Auperin A, Herrera-Gomez RG, et al. Response to salvage chemotherapy after progression on immune checkpoint inhibitors in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer.* 2019;121:123-9.
61. Suzuki S, Ogawa T, Sano R, Takahara T, Inukai D, Akira S, et al. Immune-checkpoint molecules on regulatory T-cells as a potential therapeutic target in head and neck squamous cell cancers. *Cancer Sci.* 2020;111(6):1943-57.
62. 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.
63. Bauml J, Seiwert TY, Pfister DG, Worden F, Liu SV, Gilbert J, et al. Pembrolizumab for Platinum- and Cetuximab-Refractory Head and Neck Cancer: Results From a Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol.* 2017;35(14):1542-9.
64. Cohen EEW, Soulieres 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*. 2019;393(10167):156-67.
65. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulieres 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*. 2019;394(10212):1915-28.
66. 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.
67. Mehra R, Seiwert TY, Gupta S, Weiss J, Gluck I, Eder JP, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: pooled analyses after long-term follow-up in KEYNOTE-012. *Br J Cancer*. 2018;119(2):153-9.
68. Zandberg DP, Algazi AP, Jimeno A, Good JS, Fayette J, Bouganim N, et al. Durvalumab for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Results from a single-arm, phase II study in patients with  $\geq 25\%$  tumour cell PD-L1 expression who have progressed on platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2019;107:142-52.
69. Siu LL, Even C, Mesía R, Remenar E, Daste A, Delord JP, et al. Safety and Efficacy of Durvalumab With or Without Tremelimumab in Patients With PD-L1-Low/Negative Recurrent or Metastatic HNSCC: The Phase 2 CONDOR Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2019;5(2):195-203.
70. 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 Oncol*. 2019;15(7):687-94.
71. 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.
72. Chow LQM, Haddad R, Gupta S, Mahipal A, Mehra R, Tahara M, et al. Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase 1b KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J Clin Oncol*. 2016;34(32):3838-45.
73. Saloura V, Izumchenko E, Zuo Z, Bao R, Korzinkin M, Ozerov I, et al. Immune profiles in primary squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*. 2019;96:77-88.
74. Schneider K, Marbaix E, Bouzin C, Hamoir M, Mahy P, Bol V, et al. Immune cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma and patient outcome: a retrospective study. *Acta Oncol*. 2018;57(9):1165-72.
75. Simon S, Labarriere N. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncoimmunology*. 2017;7(1):e1364828.
76. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(3):205-16.

77. Mulkey F, Theoret MR, Keegan P, Pazdur R, Sridhara R. Comparison of iRECIST versus RECIST V.1.1 in patients treated with an anti-PD-1 or PD-L1 antibody: pooled FDA analysis. *J Immunother Cancer*. 2020;8(1).
78. Hales RK, Banchereau J, Ribas A, Tarhini AA, Weber JS, Fox BA, et al. Assessing oncologic benefit in clinical trials of immunotherapy agents. *Ann Oncol*. 2010;21(10):1944-51.
79. Uppaluri R, Campbell KM, Egloff AM, Zolkind P, Skidmore ZL, Nussenbaum B, et al. Neoadjuvant and Adjuvant Pembrolizumab in Resectable Locally Advanced, Human Papillomavirus-Unrelated Head and Neck Cancer: A Multicenter, Phase 2 Trial. *Clin Cancer Res*. 2020.
80. Dwary AD, Master S, Patel A, Cole C, Mansour R, Mills G, et al. Excellent response to chemotherapy post immunotherapy. *Oncotarget*. 2017;8(53):91795-802.
81. Haddad R, Cohen EEW, Venkatachalam M, Young K, Singh P, Shaw JW, et al. Cost-effectiveness analysis of nivolumab for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck in the United States. *J Med Econ*. 2020;23(5):442-7.
82. Ferris RL. Progress in head and neck cancer immunotherapy: can tolerance and immune suppression be reversed? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2004;66(6):332-40.
83. Hadler-Olsen E, Wirsing AM. Tissue-infiltrating immune cells as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2019;120(7):714-27.
84. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 7. Aufl. ed. Wittekind C, editor. Weinheim2010.
85. Zhang H, Chen J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *J Cancer*. 2018;9(10):1773-81.
86. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet*. 2001;357(9270):1777-89.
87. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-34.
88. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996;8(5):765-72.
89. Lussier DM, O'Neill L, Nieves LM, McAfee MS, Holechek SA, Collins AW, et al. Enhanced T-cell immunity to osteosarcoma through antibody blockade of PD-1/PD-L1 interactions. *J Immunother*. 2015;38(3):96-106.
90. Ngamphaiboon N, Chureemas T, Siripoon T, Arsa L, Trachu N, Jiarpinitnun C, et al. Characteristics and impact of programmed death-ligand 1 expression, CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes, and p16 status in head and neck squamous cell carcinoma. *Med Oncol*. 2019;36(2):21.
91. Zhu Q, Cai MY, Chen CL, Hu H, Lin HX, Li M, et al. Tumor cells PD-L1 expression as a favorable prognosis factor in nasopharyngeal carcinoma patients with pre-existing intratumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology*. 2017;6(5):e1312240.
92. Klein E, Becker S, Svedmyr E, Jondal M, Vanky F. Tumor infiltrating lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 1976;276:207-16.
93. Wolf GT, Hudson JL, Peterson KA, Miller HL, McClatchey KD. Lymphocyte subpopulations infiltrating squamous carcinomas of the head and neck: correlations with extent of tumor and prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1986;95(2):142-52.

94. Daud AI, Loo K, Pauli ML, Sanchez-Rodriguez R, Sandoval PM, Taravati K, et al. Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. *J Clin Invest*. 2016;126(9):3447-52.
95. Balermipas P, Michel Y, Wagenblast J, Seitz O, Weiss C, Rodel F, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(2):501-9.
96. De Meulenaere A, Vermassen T, Aspeslagh S, Deron P, Duprez F, Laukens D, et al. Tumor PD-L1 status and CD8(+) tumor-infiltrating T cells: markers of improved prognosis in oropharyngeal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(46):80443-52.
97. Vassilakopoulou M, Avgeris M, Velcheti V, Kotoula V, Rampias T, Chatzopoulos K, et al. Evaluation of PD-L1 Expression and Associated Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(3):704-13.
98. Plzak J, Boucek J, Bandurova V, Kolar M, Hradilova M, Szabo P, et al. The Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Microenvironment as a Potential Target for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4).
99. Stenzel PJ, Schindeldecker M, Tagscherer KE, Foersch S, Herpel E, Hohenfellner M, et al. Prognostic and Predictive Value of Tumor-infiltrating Leukocytes and of Immune Checkpoint Molecules PD1 and PDL1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Transl Oncol*. 2020;13(2):336-45.
100. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J*. 1957;1(5022):779-86.
101. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:16-25.
102. Yoo SH, Keam B, Ock CY, Kim S, Han B, Kim JW, et al. Prognostic value of the association between MHC class I downregulation and PD-L1 upregulation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep*. 2019;9(1):7680.
103. 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. *EMBO J*. 1992;11(11):3887-95.
104. 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.
105. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol*. 2003;170(3):1257-66.
106. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol*. 2002;32(3):634-43.
107. Scott E, Strome SE, Haidong Dong, Hideto Tamura, Stephen G. Voss, Dallas B. Flies, Koji Tamada, Diva Salomao, John Cheville, Fumiya Hirano, Wei Lin, Jan L. Kasperbauer, Karla V. Ballman, and Lieping Chen. B7-H1 Blockade Augments Adoptive T-Cell Immunotherapy for Squamous Cell Carcinoma. *CANCER RESEARCH* 63. 2003:6501-5.
108. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2(3):261-8.

109. 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.
110. Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, Iwai H, Otsuki N, Jin H, et al. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;307(3):672-7.
111. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*. 2017;8(57):97671-82.
112. Badr M, Johrens K, Allgauer M, Boxberg M, Weichert W, Tinhofer I, et al. Morphomolecular analysis of the immune tumor microenvironment in human head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(9):1443-54.
113. Wang Q, Liu F, Liu L. Prognostic significance of PD-L1 in solid tumor: An updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(18):e6369.
114. 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.
115. Information DfMDu. ICD-10-GM Version 2020; Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information; Stand 20.09.2019; Website besucht am 10.07.2020. 2020.
116. Kuefer R, Hofer MD, Gschwend JE, Rubin MA. Tissue-Microarrays. *Der Urologe, Ausgabe A*. 2004;43(6):659-68.
117. Riede U-N, Werner M. *Allgemeine und Spezielle Pathologie (E-Book)*. 2nd ed. 2017 ed. Riede U-N, Werner M, editors: Springer-Verlag; 2017.
118. Schildhaus HU. [Predictive value of PD-L1 diagnostics]. *Pathologe*. 2018;39(6):498-519.
119. 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. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(3):330-7.
120. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
121. Hirshoren N, Al-Kharouf I, Weinberger JM, Eliashar R, Popovtzer A, Knaanie A, et al. Spatial Intratumoral Heterogeneity Expression of PD-L1 Antigen in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncology*. 2021:1-7.
122. So YK, Byeon SJ, Ku BM, Ko YH, Ahn MJ, Son YI, et al. An increase of CD8(+) T cell infiltration following recurrence is a good prognosticator in HNSCC. *Sci Rep*. 2020;10(1):20059.
123. de Ruiter EJ, Mulder FJ, Koomen BM, Speel EJ, van den Hout M, de Roest RH, et al. Comparison of three PD-L1 immunohistochemical assays in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Mod Pathol*. 2020.
124. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer*. 2019;18(1):63.
125. Zhou C, Diao P, Wu Y, Wei Z, Jiang L, Zhang W, et al. Development and validation of a seven-immune-feature-based prognostic score for oral squamous cell carcinoma after curative resection. *Int J Cancer*. 2020;146(4):1152-63.
126. Gatta G, Botta L, Sanchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L, et al. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EURO CARE-5 population-based study. *Eur J Cancer*. 2015;51(15):2130-43.

127. Yin G, Guo W, Duan H, Huang Z. Role of PD-1/PD-L1 inhibitors in the treatment of recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*. 2021.
128. 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.
129. Kikuchi M, Yamashita D, Hara S, Takebayashi S, Hamaguchi K, Mizuno K, et al. Clinical significance of tumor-associated immune cells in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2021;43(2):534-43.
130. Patel JJ, Levy DA, Nguyen SA, Knochelmann HM, Day TA. Impact of PD-L1 expression and human papillomavirus status in anti-PD1/PDL1 immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma-Systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2020;42(4):774-86.
131. Succaria F, Kvistborg P, Stein JE, Engle EL, McMiller TL, Rooper LM, et al. Characterization of the tumor immune microenvironment in human papillomavirus-positive and -negative head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2020.
132. Oualla K, Castelo Branco L, Nouiyakh L, Amaadour L, Benbrahim Z, Arifi S, et al. Therapeutic Approaches With Immune Checkpoint Inhibitors in Head and Neck Cancers and the Role of PD-L1 as a Biomarker. *Cancer Control*. 2021;28:10732748211004878.
133. 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.
134. Troiano G, Caponio VCA, Zhurakivska K, Arena C, Pannone G, Mascitti M, et al. High PD-L1 expression in the tumour cells did not correlate with poor prognosis of patients suffering for oral squamous cells carcinoma: A meta-analysis of the literature. *Cell Prolif*. 2019;52(2):e12537.
135. Pan ZK, Ye F, Wu X, An HX, Wu JX. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Dis*. 2015;7(3):462-70.
136. 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.
137. De Meulenaere A, Vermassen T, Aspeslagh S, Zwaenepoel K, Deron P, Duprez F, et al. Prognostic markers in oropharyngeal squamous cell carcinoma: focus on CD70 and tumour infiltrating lymphocytes. *Pathology*. 2017;49(4):397-404.
138. 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.
139. Sanchez-Canteli M, Granda-Diaz R, Del Rio-Ibiate N, Allonca E, Lopez-Alvarez F, Agorreta J, et al. PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and better prognosis in patients with HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(10):2089-100.
140. 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.
141. 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. *Sci Transl Med.* 2012;4(127):127ra37.
142. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(19):12293-7.
143. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54(4):307-14.
144. Tsushima F, Yao S, Shin T, Flies A, Flies S, Xu H, et al. Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. *Blood.* 2007;110(1):180-5.
145. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(4):847-56.
146. 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;6(3):295-304.
147. Li J, Wang P, Xu Y. Prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in patients with head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179536.
148. 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.
149. Yang WF, Wong MCM, Thomson PJ, Li KY, Su YX. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2018;86:81-90.
150. Perea F, Sanchez-Palencia A, Gomez-Morales M, Bernal M, Concha A, Garcia MM, et al. HLA class I loss and PD-L1 expression in lung cancer: impact on T-cell infiltration and immune escape. *Oncotarget.* 2018;9(3):4120-33.
151. Roper E, Lum T, Palme CE, Ashford B, Ch'ng S, Ranson M, et al. PD-L1 expression predicts longer disease free survival in high risk head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Pathology.* 2017;49(5):499-505.
152. Lin YM, Sung WW, Hsieh MJ, Tsai SC, Lai HW, Yang SM, et al. High PD-L1 Expression Correlates with Metastasis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142656.
153. Kim HR, Ha SJ, Hong MH, Heo SJ, Koh YW, Choi EC, et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep.* 2016;6:36956.
154. Zhou Z, Mu D, Zhang D, Zhang X, Ding X, Yang J, et al. PD-L1 in Combination with CD8(+)TIL and HIF-1alpha are Promising Prognosis Predictors of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2020;12:13233-9.
155. Wang C, Zhu H, Zhou Y, Mao F, Lin Y, Pan B, et al. Prognostic Value of PD-L1 in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Breast J.* 2017;23(4):436-43.
156. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007;104(9):3360-5.
157. Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape

- through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol.* 2011;28(3):682-8.
158. Zhuan-Sun Y, Huang F, Feng M, Zhao X, Chen W, Zhu Z, et al. Prognostic value of PD-L1 overexpression for pancreatic cancer: evidence from a meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2017;10:5005-12.
159. Xu F, Xu L, Wang Q, An G, Feng G, Liu F. Clinicopathological and prognostic value of programmed death ligand-1 (PD-L1) in renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(9):14595-603.
160. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer.* 2010;116(7):1757-66.
161. Zhang M, Dong Y, Liu H, Wang Y, Zhao S, Xuan Q, et al. The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression in gastric cancer: a meta-analysis of 10 studies with 1,901 patients. *Sci Rep.* 2016;6:37933.
162. Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006;42(3):229-39.
163. Spence T, Bruce J, Yip KW, Liu FF. HPV Associated Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel).* 2016;8(8).
164. Boscolo-Rizzo P, Del Mistro A, Bussu F, Lupato V, Baboci L, Almadori G, et al. New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2013;33(2):77-87.
165. Laco J, Nekvindova J, Novakova V, Celakovsky P, Dolezalova H, Tucek L, et al. Biologic importance and prognostic significance of selected clinicopathological parameters in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, with emphasis on smoking, protein p16(INK4a) expression, and HPV status. *Neoplasma.* 2012;59(4):398-408.
166. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(4):261-9.
167. De Meulenaere A, Vermassen T, Aspeslagh S, Vandecasteele K, Rottey S, Ferdinande L. TILs in Head and Neck Cancer: Ready for Clinical Implementation and Why (Not)? *Head Neck Pathol.* 2017;11(3):354-63.
168. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, et al. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer.* 2008;122(12):2656-64.
169. de la Iglesia JV, Slebos RJC, Martin-Gomez L, Wang X, Teer JK, Tan AC, et al. Effects of Tobacco Smoking on the Tumor Immune Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2020;26(6):1474-85.
170. Almangush A, Makitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojjan P, Rinaldo A, et al. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncol.* 2020;107:104799.
171. Galon J, Pages F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med.* 2012;10:1.
172. Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol.* 1986;39(6):585-9.
173. Balch CM, Riley LB, Bae YJ, Salmeron MA, Platsoucas CD, von Eschenbach A, et al. Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch Surg.* 1990;125(2):200-5.

174. Wang G, Zhang M, Cheng M, Wang X, Li K, Chen J, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma: Functions and regulatory mechanisms. *Cancer Lett.* 2021;507:55-69.
175. Borsetto D, Tomasoni M, Payne K, Polesel J, Deganello A, Bossi P, et al. Prognostic Significance of CD4+ and CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Cancers (Basel).* 2021;13(4).
176. Nordfors C, Grun N, Tertipis N, Ahrlund-Richter A, Haegglblom L, Sivars L, et al. CD8+ and CD4+ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2013;49(11):2522-30.
177. de Ruiter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology.* 2017;6(11):e1356148.
178. Kim HJ, Cantor H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(2):91-8.
179. Shimizu S, Hiratsuka H, Koike K, Tsuchihashi K, Sonoda T, Ogi K, et al. Tumor-infiltrating CD8(+) T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 2019;8(1):80-93.
180. Oguejiofor K, Hall J, Slater C, Betts G, Hall G, Slevin N, et al. Stromal infiltration of CD8 T cells is associated with improved clinical outcome in HPV-positive oropharyngeal squamous carcinoma. *Br J Cancer.* 2015;113(6):886-93.
181. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, McHugh J, Rozek L, Virani S, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2016;38(7):1074-84.
182. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58(16):3491-4.
183. Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 2001;61(10):3932-6.
184. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1536-43.
185. Schalper KA, Brown J, Carvajal-Hausdorf D, McLaughlin J, Velcheti V, Syrigos KN, et al. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(3).
186. Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, et al. CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(7):1555-9.
187. Mumberg D, Monach PA, Wanderling S, Philip M, Toledano AY, Schreiber RD, et al. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(15):8633-8.
188. Mandal R, Senbabaoglu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, et al. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight.* 2016;1(17):e89829.
189. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer.* 2000;88(3):577-83.

190. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 1997;79(12):2320-8.
191. Bisheshar SK, De Ruiter EJ, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of NK cells and their ligands in squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1747345.
192. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):71-8.
193. Troiano G, Caponio VCA, Adipietro I, Tepedino M, Santoro R, Laino L, et al. Prognostic significance of CD68(+) and CD163(+) tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2019;93:66-75.
194. Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(5):1472-9.
195. Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis. *Cancer*. 2003;97(4):960-8.
196. Seminerio I, Kindt N, Descamps G, Bellier J, Lechien JR, Mat Q, et al. High infiltration of CD68+ macrophages is associated with poor prognoses of head and neck squamous cell carcinoma patients and is influenced by human papillomavirus. *Oncotarget*. 2018;9(13):11046-59.
197. Ni YH, Ding L, Huang XF, Dong YC, Hu QG, Hou YY. Microlocalization of CD68+ tumor-associated macrophages in tumor stroma correlated with poor clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. *Tumour Biol*. 2015;36(7):5291-8.
198. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
199. Baptista MZ, Sarian LO, Derchain SF, Pinto GA, Vassallo J. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol*. 2016;47(1):78-84.
200. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(7):2151-7.
201. Steuer CE, Griffith CC, Nannapaneni S, Patel MR, Liu Y, Magliocca KR, et al. A Correlative Analysis of PD-L1, PD-1, PD-L2, EGFR, HER2, and HER3 Expression in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(3):710-6.
202. 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.
203. Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Galon J. The prognostic impact of anti-cancer immune response: a novel classification of cancer patients. *Semin Immunopathol*. 2011;33(4):335-40.
204. Bjerkli IH, Hadler-Olsen E, Nginamau ES, Laurvik H, Soland TM, Costea DE, et al. A combined histo-score based on tumor differentiation and lymphocytic infiltrate is a robust prognostic marker for mobile tongue cancer. *Virchows Arch*. 2020;477(6):865-72.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabelle TNM-Klassifikation Kopf-Hals-Tumore (Lippe, Mundhöhle, Pharynx, große Speicheldrüsen), modifiziert nach (84).....	24
Tabelle 2: Histopathologisches Grading (84, S.24) .....	24
Tabelle 3: Residualtumor (84, S.19) .....	24
Tabelle 4: Stadiengruppierung nach UICC (84, S.28,34,35,53) .....	25
Tabelle 5: ICD-Codes (115) .....	36
Tabelle 6: Geräte .....	40
Tabelle 7: Chemikalien/Reagenzien .....	40
Tabelle 8: Arbeits- und Verbrauchsmaterial .....	41
Tabelle 9: Primär-Antikörper für immunhistochemische Färbung.....	42
Tabelle 10: Programme .....	45
Tabelle 11: Häufigkeitstabelle: TNM-Stadium, Grading, Lymphgefäß-/ Venen- und perineurale Infiltration .....	49
Tabelle 12: Anzahl der Patienten anhand des KTSS .....	54
Tabelle 13: Anzahl der Patienten anhand des TPS.....	54
Tabelle 14: Überleben der Patienten bezogen auf Jahre in Prozent .....	62
Tabelle 15: Verteilung der Patienten in den PD-L1-Kategorien (KTSS).....	63
Tabelle 16: Verteilung der Patienten in den PD-L1-Kategorien (TPS) .....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Karzinogenese (27) .....	11
Abbildung 2: angeborenes und erworbenes Immunsystem (85) .....	26
Abbildung 3: Reaktivierung der Anti-Tumor-Immunantwort durch Checkpoint- Inhibitoren (9).....	28
Abbildung 4: PD-1/PD-L1- Signalweg (55) .....	32
Abbildung 5: TMA 1 (Patientenkollektiv 2010-2013 mit immunhistochemischer CD3- Färbung) .....	37
Abbildung 6: TMA 2 (Patientenkollektiv 2014-2015 mit immunhistochemischer CD3- Färbung) .....	38
Abbildung 7: Boxplot - Alter bei Diagnose aufgeteilt nach Geschlecht.....	47
Abbildung 8: PD-L1-Expression in Abhängigkeit des Geschlechts .....	48
Abbildung 9: Lokalisationen der untersuchten Plattenepithelkarzinome .....	48
Abbildung 10: Verteilung der UICC-Stadien .....	51
Abbildung 11: Boxplot: CD3-Infiltration in Abhängigkeit der PD-L1-Expression.....	55
Abbildung 12: Beispiel Streudiagramm - Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression und CD3-positiven Immunzellen .....	55
Abbildung 13: Boxplot: CD4-Infiltration in Abhängigkeit der PD-L1-Expression.....	56
Abbildung 14: Boxplot: CD8-Infiltration in Abhängigkeit der PD-L1-Expression.....	57
Abbildung 15: Boxplot: CD56-Infiltration in Abhängigkeit der PD-L1-Expression.....	58
Abbildung 16: Boxplot: CD68-Infiltration in Abhängigkeit der PD-L1-Expression.....	59
Abbildung 17: Boxplot: PD-1-Expression in Abhängigkeit der PD-L1-Expression.....	60
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve: Gesamtüberleben in Monaten .....	61
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten nach UICC-Stadium .....	63
Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten nach PD-L1- Expression .....	65
Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten nach PD-L1- Expression (2 Gruppen).....	66
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der CD3-Expression.....	67
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der CD4-Expression.....	67

Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der CD8-Expression.....	68
Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der CD56-Expression.....	68
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der CD68-Expression.....	69
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve: Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit der PD-1-Expression.....	69
Abbildung 28: TMArrayer 1 .....	VI
Abbildung 29: TMArrayer 2 .....	VI
Abbildung 30: Rotationsmikrotom .....	VII
Abbildung 31: Beispiel-Core mit geringer Anzahl CD8-positiver Zellen.....	VII
Abbildung 32: Beispiel-Core mit mittlerer Anzahl CD8-positiver Zellen.....	VIII
Abbildung 33: Beispiel-Core mit hoher Anzahl CD8-positiver Zellen.....	VIII
Abbildung 34: Beispiel-Core mit geringer PD-L1-Expression .....	IX
Abbildung 35: Beispiel-Core mit hoher PD-L1-Expression .....	IX
Abbildung 36: QuPath-Auswertung PD-L1 positiver/negativer Zellen (positiv-rot, negativ-blau) .....	X
Abbildung 37: QuPath-Auswertung PD-L1 komplett.....	XI
Abbildung 38: QuPath-Auswertung CD3 .....	XI
Abbildung 39: QuPath-Auswertung CD4 .....	XII

Danksagung

Lebenslauf

Mainz, 02.09.2021

