Assoziation eines MHC I-Verlustes mit der Lokalisation und Anzahl zytotoxischer Lymphozyten im HPV-assoziierten Oropharynxkarzinom

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Tosun, Saskia Carolin (geb. Evers)

aus Langen

Gießen (2023)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Abteilung für HNO-Tumorforschung,
Klinik für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie

Gutachter: Prof. Dr. Wittekindt, Claus
Gutachter: Prof. Dr. Gattenlöhner, Stefan

Tag der Disputation: 16.04.2024

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Das Oropharynxkarzinom 1

1.1.1 Inzidenz und Risikofaktoren 1

1.1.2 Screening und Prävention 2

1.1.3 Diagnostik 2

1.1.4 TNM-Klassifikation 3

1.1.5 Histopathologische Einteilung 5

1.1.6 Therapiemöglichkeiten 5

1.1.7 Karzinogenese 7

1.2 Humane Papillomaviren 9

1.2.1 Epidemiologie 9

1.2.2 Virale Onkogenese 10

1.3 Das Immunsystem 13

1.3.1 „*Major Histocompatibility Complex I*“ 14

1.3.1.1 Molekularer Aufbau des MHC I 14

1.3.1.2 Funktion des MHC I 16

1.3.2 Natürliche Killerzellen 18

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit 20

2. Material und Methodik 21

2.1 Das Patientenkollektiv 21

2.2 Material 22

2.2.1 Geräte 22

2.2.2 Chemikalien 23

2.2.3 Puffer 24

2.2.4 Kit-Systeme 24

2.2.5 Antikörper 25

2.3 Methodik 26

2.3.1 Bestimmung des HPV-Status 26

2.3.2 Immunhistochemie 26

2.3.2.1 Anfertigung der Gewebeschnitte 26

2.3.2.2 Entparaffinieren und Blocken unspezifischer Bindungsstellen ..27
2.3.2.3 Primärantikörper (Anti-GZMB) 27
2.3.2.4 Primärantikörper (Anti-GZMB, Anti-b2M) 28
2.3.2.5 Kernfärbung 29
2.3.2.6 Dehydrierung und Eindeckung..... 29
2.3.3 Auswertung der Immunhistochemie 29
2.3.4 Statistische Auswertung 33

3. Ergebnisse 34

3.1 Das Gesamtkollektiv und der HPV-Status 34

3.1.1 Überleben der Patienten im Gesamtkollektiv..... 34
3.1.2 Überleben der Patienten nach dem HPV-Status aufgetrennt 35

3.2 Beta-2-Mikroglobilin..... 36

3.2.1 Verteilung des b2M-Verlustes im Gesamtkollektiv..... 36
3.2.2 Überleben der Patienten nach dem b2M-Verlust aufgetrennt 37
3.2.3 Assoziation des b2M-Verlustes und des HPV-Status 38
3.2.4 Einfluss des b2M-Verlustes und weiterer Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben – univariate Analyse..... 41
3.2.5 Einfluss des b2M-Verlustes und weiterer Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben – multivariate Analyse 43

3.3 Granzym B..... 45

3.3.1 Verteilung GZMB+ Zellen im Gesamtkollektiv 45
3.3.2 Überleben der Patienten nach dem GZMB-Status aufgetrennt 46
3.3.3 Assoziation des GZMB- und HPV-Status..... 46
3.3.4 Einfluss des GZMB-Status und weiterer Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben – univariate Analyse..... 49
3.3.5 Einfluss des GZMB-Status und weiterer Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben – multivariate Analyse 51

3.4 Assoziation zwischen b2M und GZMB 52

3.4.1 Verteilung GZMB/b2M im Gesamtkollektiv 52
3.4.2 Überleben aufgetrennt nach dem b2M- und GZMB-Status 54
3.4.3 Assoziation b2M/GZMB zum HPV-Status..... 56
3.4.4 Überleben stratifiziert nach dem b2M/GZMB- und HPV-Status..... 57

3.4.5 Assoziation b2M/GZMB zu weiteren Risikofaktoren 58

4. Diskussion 60

4.1 Allgemein 60

4.2 Untersuchte Antigene 61

4.2.1 Beta-2-Mikroglobulin 61

4.2.2 Granzym B 62

4.3 Der HPV-Status und das Überleben 64

4.4 Weitere Risikofaktoren 65

4.5 Ausblick 68

5. Zusammenfassung 69

6. Abstract 70

7. Abkürzungsverzeichnis 71

8. Abbildungsverzeichnis 74

9. Tabellenverzeichnis 80

10. Literaturverzeichnis 81

11. Anhang 91

12. Publikationsverzeichnis 92

13. Ehrenwörtliche Erklärung 93

14. Danksagung 94

1. Einleitung

1.1 Das Oropharynxkarzinom

1.1.1 Inzidenz und Risikofaktoren

Es erkranken weltweit jährlich 650.000 Patienten an einem Kopf-Hals-Tumor. Damit sind weltweit die Kopf-Hals-Tumoren die 6-häufigste Tumorerkrankung [47, 109]. Etwa 350.000 Patienten versterben an den Folgen der Erkrankung [50, 87]. Im Jahre 2012 wurden in Europa um die 99.600 neu aufgetretene Kopf-Hals-Tumoren beschrieben. Die Mortalität lag hierbei auf beide Geschlechter verteilt bei knapp 44%. Die altersstandardisierte Inzidenz lag bei 18,2 pro 100.000 Männer bzw. 4,9 pro 100.000 Frauen [25]. Die Gruppe der Kopf-Hals-Tumoren setzt sich aus denen der Nasenhöhle, Nasennebenhöhlen, Lippen, Mundhöhle, des Pharynx (Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx), der Speicheldrüsen und des Larynx zusammen [89]. Von den Kopf-Hals-Tumoren sind beinahe 90% Plattenepithelkarzinome [50, 87]. Ungefähr die Hälfte der Kopf-Hals-Tumoren finden sich in der Mundhöhle. Hiervon bildet wiederum das Oropharynxkarzinom den größten Anteil [79]. In einer Studie von Wittekindt et al. (2019) konnte in dem Zeitraum von 2000-2017 eine signifikante Erhöhung der Neuerkrankungen des Oropharynxkarzinoms in Deutschland und der USA gezeigt werden. In den USA stieg die Inzidenz in der männlichen Bevölkerung jedoch stärker als bei der weiblichen Bevölkerung an. In Deutschland zeigte sich lediglich bei Frauen ein signifikanter Anstieg der Inzidenz [106].

Als Hauptrisikofaktoren gelten chronischer Tabak- sowie Alkoholkonsum [76]. Diese steigern das Risiko eines Oropharynxkarzinoms um das 6-fache. Liegen beide Risikofaktoren kombiniert vor, erhöht sich das Risiko um das 30-fache. Auch eine zu einseitige Ernährung mit übermäßigem Verzehr von Fleisch und gebratenem Essen gelten als prädisponierend. Ein protektiver Faktor ist hingegen eine mediterrane Ernährung. Hier gelten besonders die Zitrusfrüchte sowie Oliven- und Fischöle als protektiv [112].

Die squamöse intraepitheliale Neoplasie (SIN) im Sinne einer Leukoplakie sowie eine persistierende Virusinfektion mit einem der „*high risk*“ Humanen Papilloma Viren sind als Risikofaktoren zu werten.

1.1.2 Screening und Prävention

Aufgrund des zunächst meist schmerzlosen Wachstums des Oropharynxkarzinoms werden die meisten Patienten erst mit einem fortgeschrittenen Stadium des Tumors vorstellig. Um eine Läsion möglichst frühzeitig diagnostizieren zu können, empfiehlt die aktuelle S3-Leitlinie eine regelmäßige Kontrolle der Mundschleimhaut durch Zahn-, aber auch HNO- sowie MGK-Ärzte. Besonders Patienten mit den oben genannten prädisponierenden Faktoren sollten dabei engmaschig untersucht werden. Ein effektives Screening Programm steht zurzeit jedoch noch nicht zur Verfügung [112].

1.1.3 Diagnostik

Zur primären Diagnostik des Oropharynxkarzinoms sollte gemäß der aktuellen S3-Leitlinie eine klinische Untersuchung erfolgen. Es gelten alle Schleimhautläsionen als tumorverdächtig, die länger als zwei Wochen bestehen. Diese sollten durch eine Biopsie eingehender untersucht werden. Bei ca. 4-33% der Patienten, die an einem Oropharynxkarzinom erkrankt sind, treten synchrone Zweittumoren auf. Daher sollte bei einer klinischen Untersuchung stets auch eine Laryngoskopie durchgeführt werden. In der klinischen Untersuchung zeigt sich, bei Vorliegen eines Oropharynxkarzinoms, typischerweise ein zentrales Ulkus der Mundschleimhaut mit einem peripheren Randwall. Aufgrund der Keratinisierung bestehen häufig weißliche Ablagerungen. Bereits im Anfangsstadium kann es zu Begleitsymptomen wie der Zahnlockerung oder einer Lymphknotenschwellung kommen. Diese sollten nicht mit einer entzündlichen Erkrankung und begleitender Lymphadenitis verwechselt werden. Erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium ist mit funktionellen Beeinträchtigungen und starken Schmerzen zu rechnen. Neben einer allgemeinen B-Symptomatik im Sinne von Müdigkeit, Gewichtsverlust und Nachtschweiß, können weitere unspezifische Symptome wie z.B. ein „*foetor ex ore*“ oder Blutungen auftreten [112].

Zur weiteren Abklärung und „*Staging*“ kann die klinische Untersuchung durch bildgebende Maßnahmen erweitert werden. Als zahnärztliche Basisdiagnostik sollte eine Panorama-Schichtaufnahme einer „*Cone Beam CT*“ (Dental-CT) vorgezogen werden. Zur Bestimmung der T-Kategorie sollte ein CT oder MRT durchgeführt werden. Die Festlegung der N-Kategorie kann durch eine Ultraschalldiagnostik mit fakultativer Feinnadelbiopsie erfolgen. Weiterhin sind auch hier anhand von CT oder MRT Aussagen

über suspekte Lymphknotenvergrößerungen zu treffen. Die MRT-Untersuchung weist jedoch eine höhere Sensitivität und Spezifität auf. Diese können in Kombination des MRT mit einem FDG-PET-CT noch weiter verbessert werden. Bei einem fortgeschrittenen T-Stadium sollte bereits bei der Primärdiagnostik das M-Stadium mittels CT-Thorax bestimmt werden. Besteht der Verdacht auf ein Tumorrezidiv, der nicht abschließend mittels CT- oder MRT-Untersuchung zu klären ist, kann eine PET/CT-Untersuchung durchgeführt werden [112].

1.1.4 TNM-Klassifikation

Die anatomische Tumorausbreitung wird anhand der TNM-Klassifikation beschrieben, dem so genannten „*Staging*“. Je nach Zeitpunkt können ein präoperatives, ein intraoperatives und ein postoperatives „*Staging*“ unterschieden werden [82].

Die TNM-Klassifikation wurde in den Jahren 1943-1952 von Pierre Denoix etabliert. Im Jahre 1953 einigten sich die „*International Commission on Stage-Grouping in Cancer and Presentation of the Results of Treatment of Cancer* “ und das “*Committee on Tumour Nomenclature and Statistics*” im Rahmen des internationalen-Radiologenkongress auf eine einheitliche Klassifikation, deren Grundlage die TNM-Klassifikation bilden sollte [2]. Dabei bildet das TNM-System folgende Kategorien ab:

T-Stadium	Tumorausbreitung
N-Stadium	lokaler Lymphknotenbefall
M-Stadium	Fernmetastasen

Zusätzlich kann jeweils mit einem weiteren Buchstaben die Art der Untersuchung angegeben werden. Hierbei steht „c“ für eine klinische Diagnose, „p“ für eine pathologische Untersuchung und „u“ für eine Klassifikation durch eine Ultraschalluntersuchung. Weiterhin kann die Validität der Diagnose anhand des C-Faktors angegeben werden [104].

Ist bereits eine neoadjuvante Chemotherapie erfolgt, wir der Buchstabe „y“, bei einem Tumorrezidiv ein „r“ der TNM-Klassifikation vorgestellt [82].

Die N-Kategorie umfasst bei den Kopf-Halstumoren, die nach Robbins et al. 2002 definierten Lymphknotenstationen: die submentalen (Ia), submandibulären (Ib), ventral (IIa) und dorsal (IIb) der V. jugularis gelegenen, die mittleren (III) und unteren (IV) Lymphknoten, sowie die des hinteren Halsdreiecks, die oberhalb (Va) bzw. unterhalb (Vb) des M. omohyoideus gelegen sind und die anterioren prätrachealen (VI) Lymphknoten [42].

Die 7. Auflage (2010) der TNM-Klassifikation des Oropharynxkarzinoms gliedert sich wie folgt [103]:

T1	Tumorausbreitung maximal 2cm
T2	Tumor größer als 2cm, maximal 4cm
T3	Tumorausbreitung über 4cm oder auf lingualer Fläche der Epiglottis
T4a	Tumor infiltriert den Larynx, die äußere Zungenmuskulatur, die Lamina medialis des Proc. Pterygoideus, den harten Gaumen oder den Unterkiefer
T4b	Tumor infiltriert den M. pterygoideus lat., die Lamina lateralis des Proc. Pterygoideus oder Schädelbasis, bzw. ummauert die Arteria carotis interna
N1	einzelne Lymphknotenmetastase von maximal 3cm
N2a	einzelne Lymphknotenmetastase größer 3cm, maximal 6cm
N2b	mehrere LK-Metastasen ipsilateral, maximal 6cm
N2c	mehrere LK-Metastasen kontralateral oder Ausdehnung größer 6cm
N3a	LK-Metastasen Ausdehnung über 6cm
N3b	Ausdehnung bis in die Supraklavikulargrube
M1	Fernmetastasen

Die UICC hat die TNM-Klassifikation als Grundlage einer Einteilung von Stadien genutzt, die jeweils eine Kombination verschiedener Kategorien des TNM-Systems beinhalten und Aussagen über die Prognose sowie die Therapieentscheidung erlauben. Diese werden ähnlich wie die S3-Leitlinien sowie die TNM-Klassifikation, in regelmäßigen Abständen aktualisiert und angepasst.

In dieser Arbeit wurde die UICC Einteilung der 7. Auflage (2010) verwendet [19]:

Stadium I	T1 N0 M0
Stadium II	T2 N0 M0
Stadium III	T3 N0 M0 bis T3 N1 M0
Stadium IVa	T1-3 N2 M0, oder T4a N0-2 M0
Stadium IVb	jedes T N3 M0, oder T4b N0-3 M0
Stadium IVc	M1

1.1.5 Histopathologische Einteilung

Die histopathologische Einteilung des Tumors nach seinem Differenzierungsgrad wird als „*Grading*“ bezeichnet. Dabei werden die Tumorzellen dahingehend eingeteilt, inwieweit sie differenziert, also ihrem Ursprungsgewebe ähnlich sind. Es werden folgende Differenzierungsgerade unterschieden [10, 19]:

„Grade“ x:	Differenzierungsgrad nicht beurteilbar
„Grade“ 1:	gut differenziert
„Grade“ 2:	moderat differenziert
„Grade“ 3:	schlecht differenziert
„Grade“ 4:	undifferenziert

Dabei steigt mit abnehmendem Differenzierungsgrad die Aggressivität des Tumors.

1.1.6 Therapiemöglichkeiten

Kurative Behandlungsmöglichkeiten der Kopf-Hals-Tumoren bilden die Strahlen-, Chemo- und operative Therapie bzw. deren Kombinationen. In der Regel wird in Deutschland nach der primären chirurgischen Therapie eine adjuvante Radiotherapie angeschlossen [110].

Bei der individuellen Auswahl des Therapiekonzeptes sollten neben dem Wunsch des Patienten insgesondere der Allgemein- und Ernährungszustand, sowie die Begleiterkrankungen berücksichtigt werden. Häufig auftretende Begleiterkrankungen beim Oropharynxkarzinom sind Aufgrund der gemeinsamen Assoziation mit Tabak- und

Alkoholkonsum die pAVK, COPD, neurologische Defizite, sowie Hepato- oder Nephropathien [38]. Um ein möglichst individuell auf den Patienten abgestimmtes Therapiekonzept erstellen zu können, sollte dies im Rahmen eines interdisziplinären Tumorboards festgelegt werden. Neben dem Ziel der kurativen Therapie sollten beim Mundhöhlenkarzinom und Oropharynxkarzinom besonders die Artikulation, die Phonation sowie die Kau- und Schluckfunktion erhalten bleiben. Neben der interdisziplinären Betreuung durch das Tumorboard sollten auch Ernährungsberater sowie Zahnärzte in die Betreuung der Patienten einbezogen werden [112].

Bei der Entscheidung zur chirurgischen Therapie sollte die Resektabilität bedacht werden, da ein R1- bzw. R2-Status das „*Outcome*“ der Patienten verschlechtert. Kann der Tumor nicht vollständig entfernt werden sollte eine Nachresektion oder eine Bestrahlung mit mindestens 60Gy zur lokalen Tumorkontrolle erfolgen [112].

Ist in der klinischen Untersuchung nicht von einer Lymphknotenbeteiligung auszugehen, kann elektiv eine „*Neck Dissection*“ durchgeführt werden [38]. Da ab einer Tumordicke von 4mm mit einer ipsilateralen Lymphknotenbeteiligung gerechnet werden kann, sollte hier eine „*Neck Dissection*“ erfolgen, wobei verschiedene Modifikationen bestehen, die unterschiedlich radikale Exzisionen beinhalten [112]. Besteht ein positiver pN-Status, sollte eine postoperative Bestrahlung des Lymphabflussgebietes erfolgen [38].

Bei einem fortgeschrittenen T-Stadium (T3/T4), einer R1- bzw. R2-Situation oder einem positiven N-Stadium sollte eine adjuvante Radio- oder Radiochemotherapie durchgeführt werden. Dabei sollte die Strahlentherapie möglichst früh begonnen und das Chemotherapeutikum Cisplatin als Einzel- oder Kombipräpparat verwendet werden [112]. Verschiedene Studien zur Kombination der adjuvanten Radiochemotherapie mit einer Zytostatikatherapie (z.B. Docetaxel, Paclitaxel) zeigen Hinweise für ein besseres Ansprechen HPV-induzierter Oropharynxkarzinome [110].

In Zellkulturmodellen von HPV-positiven sowie -negativen Oropharynxkarzinomen konnte von Rieckmann et al. sowie Arenz et al. ein signifikant vermindertes Überleben der HPV-positiven Tumorzelllinie nach Bestrahlung gezeigt werden [4, 74]. Dies könnte für eine höhere Strahlenempfindlichkeit HPV induzierter Oropharynxkarzinome sprechen [110].

1.1.7 Karzinogenese

Es gibt verschiedene Mechanismen, die eine maligne Transformation einer Zelle begünstigen. Hanahan und Weinberg haben 2000 sechs „*cancer hallmarks*“ beschrieben, denen die Karzinogenese zugrunde liegt [31]: Die Unabhängigkeit von externen Wachstums-fördernden und -hemmenden Faktoren/Signalen, das Umgehen der Apoptose, ein unbegrenztes replikatives Potential, eine kontinuierliche Angiogenese, sowie das Eindringen und metastasieren in angrenzende Gewebe.

Da die Zelle über Reparaturmechanismen verfügt, entsteht nicht aus jeder DNA-Veränderung eine kanzerogene Zelle. Eine Schädigung der DNA wird unter anderem durch diese exogenen Noxen induziert: UV-Strahlung (physikalisch), Alkohol und Tabak (chemisch) sowie onkogene Viren (biologisch) [109]. Entscheidend ist dabei der Zeitpunkt der DNA-Schädigung im Zellzyklus. Nach Baylin (1997) gelten besonders die späte G1-Phase sowie die frühe DNA-Synthesephase als vulnerabel [82].

Während des Zellzyklus wird die DNA mehrfach auf Fehler überprüft und ggf. der Zellzyklus unterbrochen oder die Apoptose der Zelle eingeleitet. Hierbei spielen unter Anderem das Retinoblastomaprotein RB1 (pRB) sowie das Tumorsuppressorprotein p53 eine entscheidende Rolle. In einer Studie von Watson et al. (2013) konnte in 11 von 15 Tumorarten eine Mutation in TP53 nachgewiesen werden [101]. Bei den Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches liegt die Mutationsrate des TP53 bei ungefähr 40% vor. Neben den Mutationen im TP53 finden sich auch häufig Mutationen in den Genen von RB1 sowie CDKN2A ($p16^{INK4A}$) [110]. Im Gegensatz dazu fehlen diese Mutationen häufig bei HPV-induzierten Oropharynxkarzinomen [95]. Die HPV-induzierte Karzinogenese wird in Kapitel 1.2.2 näher erläutert.

Wie bereits in Kapitel 1.1.1 erläutert, gehören der Alkohol- und Tabakkonsum zu den größten Risikofaktoren für Kopf-Hals-Tumoren [14, 83]. Die chemisch-induzierte Karzinogenese geht meist mit einer durch ein Agens induzierten promutagene Läsion der DNA einher, die im Verlauf der Replikation, bei fehlender oder unzureichender Reparatur, als Mutation weitergegeben wird. Eine durch ein Agens induzierte Alkylierung der DNA-Basen kann beispielsweise zu einer Fehlpaarung der modifizierten Base oder durch Veränderung der Stabilität einem Strangbruch führen [54, 82, 111]. Ein Doppelstrangbruch der DNA kann bei fehlerhafter Reparatur zu einer Translokation

führen, wodurch es beispielsweise zu einer Veränderung in dem codierenden Abschnitt für das Tumorsuppressorgen kommen kann. [26, 100]

Acetaldehyd, welches als Zwischenprodukt beim Abbau von Ethanol entsteht und in Zigarettenrauch vorkommt gilt als promutagen. Weiterhin kann es zu einer Alkoholinduzierten aberranten DNA-Methylierung kommen. Eine Hypermethylierung in der Promoterregion eines Gens führt zu einer Gen-Inaktivierung. Solche Hypermethylierungen wurden beispielsweise in der Promoterregion des CDKN2A ($p16^{INK4A}$) bei Probanden mit regelmäßigem Alkohol- und Tabakkonsum nachgewiesen [22, 40, 91, 92].

Neben der chemischen Karzinogenese spielt für das Oropharynxkarzinom die viral induzierte Karzinogenese die zweitgrößte Rolle [110]. Man geht davon aus, dass insgesamt 15-20% aller Karzinome durch eine virale Infektion induziert werden [58]. Von der WHO werden unter anderem folgende Viren als onkogen anerkannt [85]:

Humane Papilloma Viren (z.B. HPV 16, 18, 30)
Herpesviren (z.B. das Ebstein-Barr-Virus, Herpesvirus 8)
Das humane-T-lymphotrophe-Virus 1
Das Hepatitis-B-Virus
Das Hepatitis-C-Virus

1.2 Humane Papillomaviren

1.2.1 Epidemiologie

Es konnten bislang über 200 HPV-Typen identifiziert werden. Vor ungefähr 40 Jahren wurde das Humane Papilloma Virus 16 erstmals im Zusammenhang mit dem Zervixkarzinom beschrieben [30]. Von der *WHO* sind inzwischen 12 HPV-Typen als krebserregend eingestuft: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, und 59. Die Typen 68 und 73 werden zusätzlich als möglicherweise krebserregend eingestuft.

Es konnte in epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass eine HPV-Infektion einer der Hauptfaktoren zur Entstehung des Zervixkarzinoms ist [35]. Schätzungsweise über 80% der weiblichen Bevölkerung infizieren sich im Laufe des Lebens mit dem Humanen Papilloma Virus. Dabei heilen 80-90% der Infektionen jedoch aus und persistieren nicht lange genug um eine Entartung der Zelle zu initiieren [18]. Der Hauptübertragungsweg ist hierbei die genital-genitale Infektion [110]. Neben der genitalen Infektion über ungeschützten Geschlechtsverkehr ist bei der oralen Infektion von einer Übertragung durch Speichelkontakt auszugehen. Die Auswertung einer finnischen Familien Kohortenstudie von Rintala et al. (2006) zeigte keinen Einfluss von Oralverkehr auf die Übertragung einer HPV-Infektion [75]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in der Muttermilch das Humane Papilloma Virus persistieren kann. Dabei gab es jedoch keine Assoziation einer HPV positiven Muttermilch zu oralen HPV Infektionen des Säuglings [53].

Bereits 1983 wurde von Syrjänen K. et al. eine Assoziation der HPV-Infektion mit dem Vorkommen von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle angenommen [86]. Zwei Jahre später konnte von Löning et al. virale DNA des HPV in einem Mundhöhlenkarzinom per „*southern blot*“ Verfahren nachgewiesen werden [52]. Inzwischen geht man davon aus, dass 15-25% der Kopf-Hals-Tumoren HPV induziert sind [107].

1.2.2 Virale Onkogenese

Das Humane Papilloma Virus ist ein ikosaedrisches DNA-Virus mit einem Durchmesser von 55nm. Das Virus befällt basale Zellen von Plattenepithelien, nachdem diese z.B. bei einem Mikrotrauma exponiert werden [88]. Im Gegensatz zu den weiter differenzierten Zellen der höheren Schichten, sind diese Basalzellen noch zur Zellproliferation fähig. Das Virusgenom umfasst etwa 8kb, kodiert jedoch keine Polymerasen oder Enzyme zur Virusreplikation. Daher profitiert das Virus von den proliferativen Eigenschaften der Zielzelle [60]. Die Zellhülle besteht aus den strukturellen Proteinen L1 und L2 [71]. Dabei ist allen Papilloma Viren gemeinsam, dass ihr doppelsträngiges, zirkuläres Genom 9-10 „*open reading frames*“ (ORFs) kodiert. Diese ORFs können funktionell in 3 Abschnitte unterteilt werden. Zwei dieser Abschnitte kodieren die E- und L-Proteine. Die LCR („*long control region*“) beinhaltet das cis-Element, welches entscheidend in der Replikation und Transkription ist [88].

Nach der Endozytose des Virus durch die Zielzelle wird der Komplex aus viraler DNA sowie dem L2-Protein zunächst in den Golgi-Apparat und anschließend in den Zellkern transportiert [71]. Die Expression der viralen Proteine beginnt zunächst mit den regulatorischen E-Proteinen E1-E8 (engl. „*early*“) [33]. Durch die Teilung der Basalzellen werden die infizierten Zellen von der Basalmembran in Richtung Gewebeoberfläche verschoben. Damit verschiebt sich auch die Expression der regulatorischen Gene hin zu den L-Genen (engl. „*late*“) [95]. In der HPV-induzierten Onkogenese haben die Virusproteine E6 und E7 einen entscheidenden Anteil an der übersteigerten Zellproliferation (Abb. 1) [33, 67]. Wie bereits beschrieben verlieren die Zellen des Plattenepithels im Verlauf ihrer Differenzierung und Wanderung zur Oberfläche des Epithels die Möglichkeit zur Proliferation. Bei einer HPV-Infektion bleibt jedoch auch bei weiterer Differenzierung der infizierten Zellen, deren Zellzyklus aktiv [60]. Über einen trimeren Komplex aus dem E6 Protein, dem p35 sowie dem E6 assoziierten Protein (E6-AP) wird eine Ubiquitinierung des p53 initiiert [60, 113]. Der Abbau des ubiquitinierten p53 durch das 26S Proteasom hat neben dem Funktionsverlust der Apoptose-Einleitung durch das p53, eine fehlende Aktivierung des p21 zur Folge. Daraus resultiert eine fehlende Hemmung der Cycline D/CDK4/6 sowie E/CDK2. Diese führen daraufhin zu einer Phosphorylierung des Retinoblastomaproteins, welches in seiner hyperphosphorylierten Form inaktiv ist und das Dimer aus dem E2F-Protein und dem Dimerisierungspartner Protein freigibt. Der aktivierte E2F/DP-Komplex erleichtert

den Eintritt von der G1 in die S-Phase unter Umgehung der Kontrollpunkte [38]. Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktorem besteht aus den 8 Proteinkomplexen E2F1-E2F5, die verschiedene Gene der Zellzykluskontrolle, Mitose und Apoptose regulieren [60].

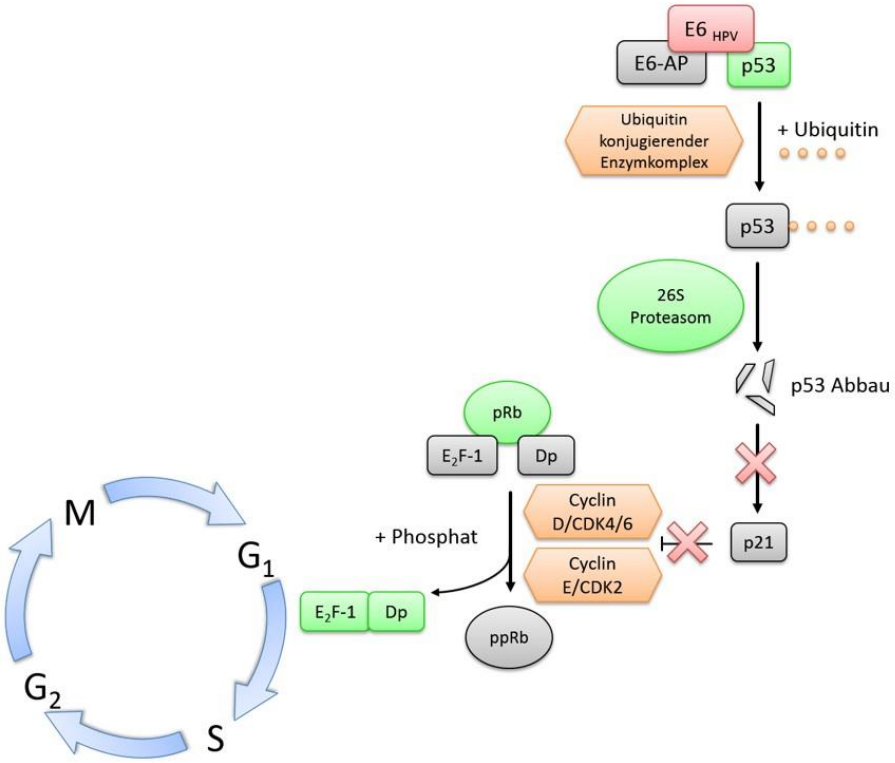


Abb. 1 Einfluss des Virusprotein E6 auf den Zellzyklus: Verlust der Apoptoseeinleitung durch Ubiquitinierung und Abbau des p53 sowie fehlende Hemmung des E2F/DP-Komplex und dadurch Erleichterung des Eintritts von der G1 in die S-Phase unter Umgehung der Kontrollpunkte.

Aber auch durch direkte Bindung des E6 an p53 sowie an Bindung der Histon-Acetyltransferasen p300, CREB-binding protein oder ADA3 kann eine Destabilisierung des p53 begünstigt werden [60]. Weiterhin induziert E6 die Expression und Aktivität der Telomerase und induziert so eine „Immortalisierung“ der Zelle [81].

Das Virusprotein E7 hat ein Molekülgewicht von ungefähr 11kDa und setzt sich aus ca. 100 Aminosäuren zusammen [59]. Das E7 führt zu einer Degradation des pRb mit einem Verlust der Kontrolle über den E2F1/Dp-Komplex (Abb. 2) [81]. Wie bereits erläutert, erleichtert dies den Übertritt von der G1- in die S-Phase.

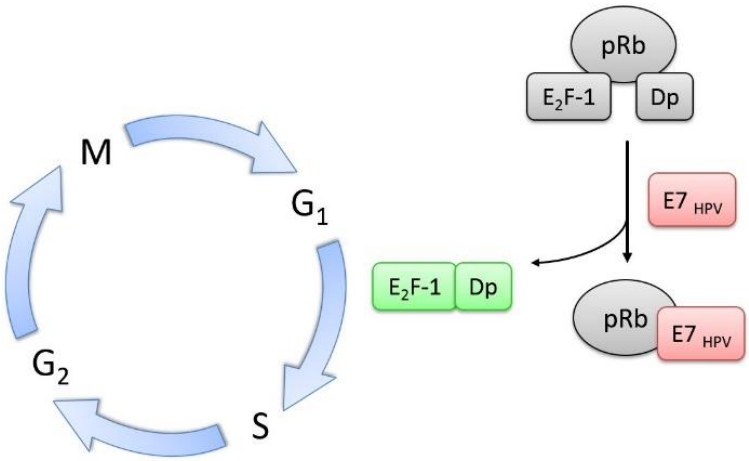


Abb. 2 Einfluss des Virusprotein E7 auf den Zellzyklus: Durch Degradation des Retinoblastomaprotein RB1 wird der E2F1/Dp-Komplex freigesetzt, welcher den Eintritt von der G1 in die S-Phase erleichtert.

Des Weiteren kann das Virusprotein E7 die cyclin-assoziierten Kinasen p21 und p27 inhibieren, sowie eine Instabilisierung des Zentromers initiieren. Weitere Interaktionspartner des E7 sind unter anderem: die S4 Untereinheit des 26-S-Proteasoms, das Mi2beta des NURD-Histonkomplex, der Transkriptionsfaktor MPP2, das AP-1 sowie das „*insulin-like growth factor binding protein 3*“ [81].

1.3 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen setzt sich aus der angeborenen „unspezifischen“ und der adaptiven „spezifischen“ Immunantwort zusammen. Erstere wird von den Epithelschichten des Gewebes, den phagozytierenden Lymphozyten (z.B. Makrophagen) sowie Natürlichen Killerzellen repräsentiert. Des Weiteren gehören lösliche Faktoren wie Zytokine, Chemokine und Hormone, sowie einige Rezeptoren zu der angeborenen Immunantwort. Dabei werden zunächst das Lysozym, die Komplementfaktoren sowie die Zytokine aktiviert. Zu ihnen zählen z. B. die Interleukine, sowie der Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) [36]. Das bekannteste Beispiel der Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr sind die Toll-like-Rezeptoren [8].

Die spezifische Immunantwort wird von der humoralen und der zellulären Immunantwort gebildet. Die humorale Abwehr besteht aus löslichen Proteinen, den Immunglobulinen. Diese werden nach Antigenpräsentation durch phagozytierende Zellen von den Plasmazellen gebildet, die aus der Reihe der B-Lymphozyten hervorgehen. Die zytotoxischen (CD8 positiven) T-Zellen bilden die zelluläre Immunantwort. Nach Aktivierung der zytotoxischen Zelle über den T-Rezeptor werden unter anderem Perforin sowie die Serinprotease Granzym ausgeschüttet. Das Perforin ist ein kalziumabhängiges Protein, das die Zellwand der Zielzelle aufweicht und so das Eindringen des Granzyms erlaubt [99]. T-Zellen können ein Antigen jedoch nur bei dessen Präsentation durch den eigenen MHC-Rezeptor erkennen. Dieses Phänomen wir als MHC-Restriktion bezeichnet (Abb. 3) [115]. Die Aktivierungskaskade der zytotoxischen T-Zelle wird vornehmlich über den T-Rezeptor, sowie das CD8-Dimer getriggert. Zusammen mit dem CD3-Rezeptor und den beiden zeta-Ketten bildet er den TCR-CD3-Komplex [63]. CD8 bindet hauptsächlich an die alpha3-Domäne des MHC I-Rezeptors und stabilisiert die Bindung der zytotoxischen T-Zelle an die Zielzelle [8, 63]. Über eine Kaskade von Signaltransduktoren werden die Caspasen 8 sowie 3 aktiviert und letztendlich über apoptotische Substrate der programmierte Zelltod der Zielzelle induziert.

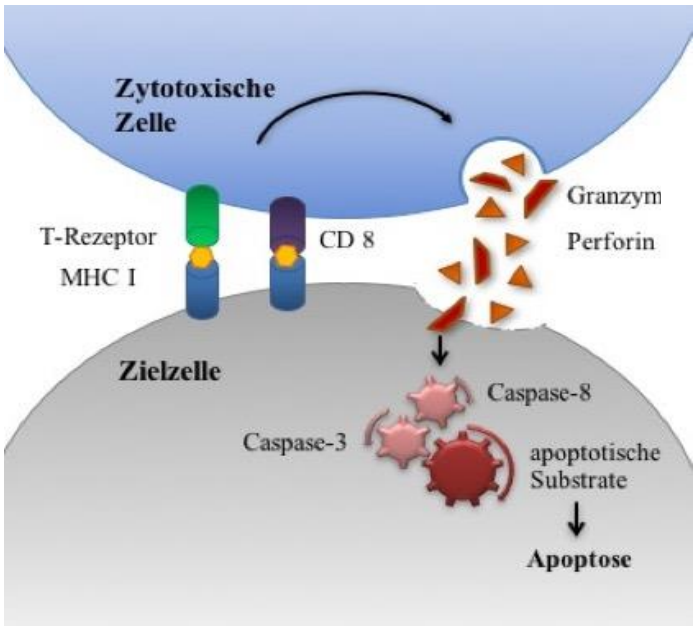


Abb. 3 T-Zell Aktivierung durch den MHC I Rezeptor: CD8 bindet an den MHC I-Rezeptor und löst eine Kaskade von Signaltransduktoren aus, welche die Caspasen 8 und 3 aktivieren und so die Apoptose einleiten.

Die T-Helfer-Zellen bilden eine Schnittstelle zwischen der humoralen und der zellulären Antwort, indem sie die Differenzierung von B- und zytotoxischen T-Lymphozyten stimulieren [8].

1.3.1 „*Major Histocompatibility Complex-I*“

1.3.1.1 Molekularer Aufbau des MHC I

Der allgemein bezeichnete „*Major Histocompatibility Complex I*“, der beim Menschen „*Human-Leukocyte-Antigen*“ (HLA) genannt wird, ist auf nahezu allen kernhaltigen Zellen der kiefertragenden Wirbeltiere zu finden [43, 68]. In dieser Arbeit wurde zur Vereinfachung die Bezeichnung MHC I gewählt. Es gilt jedoch zu beachten, dass aufgrund der humanen Gewebeproben das „*Human-Leukocyte-Antigen*“ gemeint ist.

Bei dem MHC I handelt es sich um ein in der Zellmembran verankertes Heterodimer, das aus einer leichten und einer schweren, nicht-kovalent verbunden Polypeptidkette zusammengesetzt ist [8] (Abb. 4). Der kodierende Genkomplex für die alpha-Kette von 44kDa liegt auf dem Chromosom 6. Dieser Genkomplex ist polygen, was zu einem großen Polymorphismus der Alpha-Kette führt [9]. Dieser Polymorphismus führt dazu, dass zahlreiche verschiedene Alpha-Ketten kodiert werden können, und eine dementsprechend große Anzahl an Peptiden präsentiert werden kann. Das

beta-2-Mikroglobulin von 12kDa hingegen wird auf Chromosom 15 kodiert und ist monomorph.

Es lassen sich beim MHC I vier Domänen unterscheiden. Diese sind jeweils ca. 90 Aminosäuren groß [63]. Drei von ihnen werden von der alpha-Kette gebildet, die vierte von dem beta-2-Mikroglobolin. Die alpha1-Domäne ist dabei die Einzige, die keine Disulfidbrücke enthält. Die alpha-3 Domäne weist einen transmembranen, hydrophoben Anteil auf, sowie einen kurzen Ast der in das Zytosol ragt [8]. Die alpha-1 und -2 Ketten sind an der Basis durch das beta-2-Mikroglobilin verbunden und bilden die Peptidbindungsstelle von MHC I. Hier können Peptide in langgestreckter Form bis zur Größe von 8-10 Aminosäuren gebunden werden [37, 38]. Um diese funktionelle Faltung zu ermöglichen ist die Assoziation der alpha-Kette im ER über die alpha3-Domäne mit dem beta-2-Mikroblobulin Voraussetzung [68].

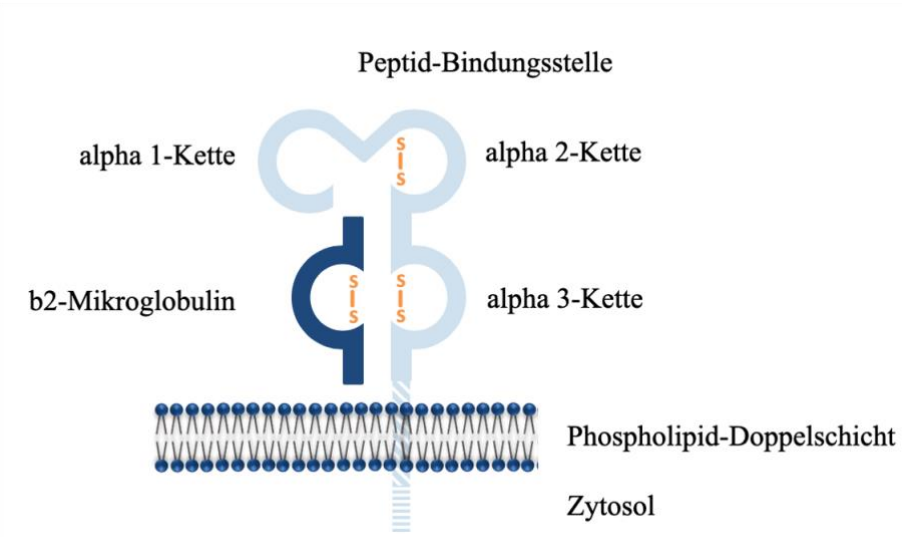


Abb. 4 Vereinfachtes Schema des MHC I Rezeptors: Das beta-2-Mikroglobulin verbindet die alpha-1 und -2 Ketten an ihrer Basis, welche die Peptid-Bindungsstelle bilden.

1.3.1.2 Funktion des MHC I

Der MHC I präsentiert sowohl endogene als auch exogene Peptide. Dadurch „markiert“ er zum einen körpereigene Zellen und ist zum anderen bei einer Infektion der Zelle entscheidend für die Aktivierung der Immunantwort.

Das virale Antigen wird im Proteasom zerlegt, einer multikatalytischen Protease, die sich im Zytosol befindet. Die entstehenden Peptide werden von dem Antigenpeptid-Transporter (TAP) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums transportiert. Dieser Transporter gehört zu der Familie von ABC-Transportern der ATP-getriebenen Pumpen [8]. Im endoplasmatischen Retikulum wird das MHC I-Polypeptid nach Bindung des zuvor prozessierten und an den TAP gebundenen Peptides gefaltet. Ein weiteres, an der Bindung des Peptides an den MHC I-Rezeptor beteiligtes Protein ist das Tapasin. Dieses hält die Bindungsgrube des MHC I-Rezeptors geöffnet bis ein entsprechendes Peptid gebunden hat [63]. Anschließend löst sich der TAP von dem fertig gefalteten Komplex und der beladene MHC I-Rezeptor wird über den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche transportiert (Abb. 5) [37].

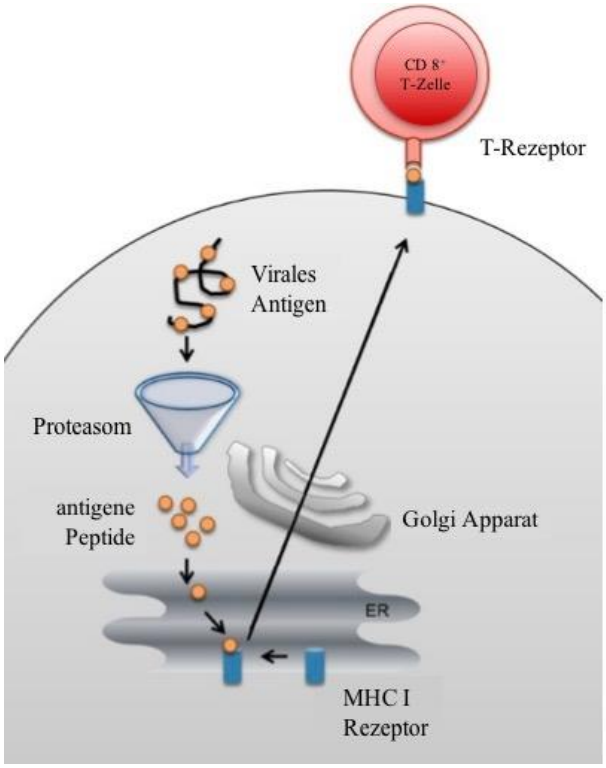


Abb. 5 „*Pathway*“ der Antigenpräsentation über den MHC I Rezeptor: Die Peptide des im Proteasom zerlegten viralen Antigens werden in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums transportiert und dort vom MHC I-Rezeptor gebunden, der wiederum den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche transportiert wird.

Gemäß Garrido et al. (1997) konnten in verschiedenen Tumorgeweben sieben unterschiedliche Phänotypen eines MHC I-Verlustes beschrieben werden. Dabei ist zu beachten, dass in dieser Arbeit die Bezeichnung „MHC I“ auch für den menschlichen „*Major Histocompatibility Complex I“* verwendet wurde (siehe 1.4.1). Die von Garrido et al. unterschiedenen Phänotypen sind [29]:

Phänotyp I	kompletter HLA-Verlust
Phänotyp II	haplotyper HLA-Verlust
Phänotyp III	isolierte Runterregulation eines der HLA A, HLA B, oder HLA C
Phänotyp IV	Verlust eines einzelnen HLA-Allels

Wie bereits in der Literatur beschrieben, wird bei einer HPV-Infektion der *„pathway“* der Antigenpräsentation durch den MHC I-Rezeptor durchbrochen. Der *„immune-escape“* durch Herunterregulierung des MHC I-Rezeptors wird durch das Protein E5 getriggert [5, 57]. Das E5 induziert eine Akkumulierung des mit dem Viruspeptid beladenen MHC I-Komplexes im Golgi-Apparat [80]. Durch die fehlende Antigenpräsentation über den MHC I-Rezeptor wird die spezifische Immunantwort umgangen. Dies kann in der Karzinogenese neben der Alteration der Apoptose, der Expression von inhibitorischen Zytokinen, sowie der Herunterregulierung der Tumorantigene als *„immune-escape“* interpretiert werden [27]. Bereits Hanahan et. al ergänzten unter Anderem zu den „*Hallmarks of Cancer“* 2011 die Vermeidung von Immunreaktionen in der Tumorgenese [32].

Eine gute Methode, um die Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten zu evaluieren ist die Messung deren Interferon-γ Produktion [90]. In der Literatur konnte eine Abnahme der Interferon Produktion bei Runterregulierung des MHC I-Rezeptors durch das Virusprotein E5 gezeigt werden [12].

1.3.2 Natürliche Killerzellen

Die Natürlichen Killerzellen gehören zu der angeborenen Immunantwort und bilden 5-10% der gesamten Leukozyten [24]. Sie tragen die Oberflächenmerkmale CD16 und CD56. Dabei weisen die meisten im Blut zirkulierenden NK-Zellen einen niedrigen Gehalt an CD56 (CD56*dim*) und eine hohe Expression des Merkmals CD16 (CD16*bright*) auf. Diese NK-Zellen werden auch als zytotoxische NK-Zellen bezeichnet und exprimieren vornehmlich zytolytische Proteine, wie das Granzym B. Die in den Lymphknoten vorkommenden Natürlichen Killerzellen weisen hingegen eine hohe Expression von CD56 (CD56*bright*) und einen niedrigen Gehalt an CD16 (CD16*dim*) auf. Man geht davon aus, dass diese NK-Zellen eine immunregulatorische Wirkung haben, da sie einen höheren Gehalt an Zytokinen exprimieren [7, 15, 99].

Aufgrund ihrer mikroskopisch gut sichtbaren Granula werden diese zytotoxischen Zellen auch als LGL („*large granular lymphocytes*“) bezeichnet [24]. Neben den zytotoxischen T-Zellen enthalten auch die Granula der NK-Zellen Perforine sowie Granzym. Der Hauptvertreter der Granzyme ist das Granzym B [99]. Die Selektion der Zielzelle erfolgt mithilfe eines inhibitorischen Rezeptors der NK-Zelle. Dieser erkennt den jeweils passenden MHC I-Rezeptor der Zielzelle [24]. Weiterhin weist die NK-Zelle einen aktivierenden Rezeptor auf, der eine ITAM-Sequenz enthält. Weitere aktivierende Signale werden über den Rezeptor 2B4 übermittelt, der der Aktivierung der T-Lymphozyten ähnelt [7]. Dies hat zur Folge, dass die Apoptose der Zielzelle lediglich dann induziert wird, wenn das aktivierende Signal über den stress-induzierten Liganden erfolgt, aber gleichzeitig das inhibitorische Signal durch das Fehlen des MHC I-Rezeptors ausfällt (Abb. 6) [24]. Mit dieser Eigenschaft ergänzt die Natürliche Killerzelle die spezifische Immunabwehr in Form der zytotoxischen T-Lymphozyten, die in Zielzellen mit entsprechender Antigenpräsentation über den MHC I-Rezeptor die Apoptose einleiten [98].

In einer Vorarbeit von Wagner et al. (2016) zeigte sich das Vorhandensein von CD56+ Zellen als unabhängiger prognostischer Marker für ein verbessertes Gesamtüberleben. Dabei korrelierte eine höhere Anzahl an CD56+ Zellen mit einem positiven HPV-Status der Patienten. Bei OSCC Patienten mit negativem HPV-Status korrelierte das Vorhandensein der CD56+ Zellen mit einem signifikant besseren Überleben [98].

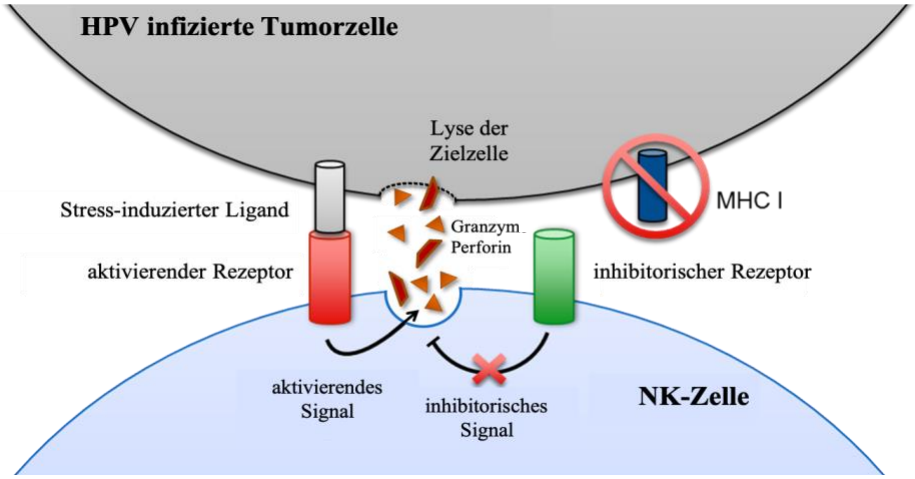


Abb. 6 Vereinfachtes Schema der Zielzell-Erkennung durch den inhibitorischen und aktivierenden Rezeptor der NK-Zelle: Fehlt der MHC I-Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle, fällt das inhibitorische Signal weg und es kann über die Bindung des Stress-induzierten Liganden an den aktivierenden Rezeptor der Natürlichen Killerzelle die Lyse der Zielzelle eingeleitet werden.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Der Einfluss der viralen Onkogenese auf das Immunsystem beim HPV-assoziierten OSCC ist bislang nicht abschließend geklärt. In der Literatur ist ein besseres Patientenüberleben beschrieben, wenn ein HPV-assoziiertes OSCC vorliegt. Dies könnte durch Unterschiede in den *„immune escape“* Mechanismen der Tumoren begründet werden. Bekannt ist, dass die Virusproteine E6 und E7 eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus haben, indem sie Tumorsuppressorproteine inhibieren. Ebenfalls Teil der Onkogenese ist der Verlust des Oberflächenrezeptors MHC I, welcher durch E5 getriggert wird. Die infolgedessen fehlende Antigenpräsentation führt zu einer Umgehung der spezifischen Immunantwort („*immune escape*“). Der Verlust des MHC I Rezeptor kann jedoch durch den Wegfall der inhibitorischen Signale zytotoxische Zellen wie beispielsweise Natürliche Killerzellen aktivieren. NK-Zellen lassen sich je nach Ausprägung bestimmter Antigene (z.B. CD56) in zytotoxische und regulatorische NK-Zellen unterscheiden. Die Aktivierung einer zytotoxischen NK-Zelle führt unter anderem durch die Ausschüttung von Granzym B zur Einleitung des Zelltods (Apoptose) der Zielzelle. Dieser Mechanismus wird durch die Aktivierung eines stress-induzierten Liganden, sowie das Fehlen eines inhibitorischen Signals wie dem MHC I Rezeptors aktiviert. In einer Vorarbeit konnte bereits eine Assoziation zwischen der Anwesenheit zytotoxischer (CD56+) Zellen und einem positiven HPV-Status beim Oropharynxkarzinom und einem besseren Gesamtüberleben dieser Patienten gezeigt werden.

Eine Hauptfrage, der in dieser Arbeit nachgegangen werden soll ist, ob bei HPV-assoziierten oder HPV-negativen Oropharynxkarzinomen eine Assoziation zwischen dem MHC I Verlust und der Anwesenheit zytotoxischer Zellen besteht. Dazu soll die Häufigkeit, sowie die Lokalisation zytotoxischer Lymphozyten im Tumorgewebe und Stroma, sowie die Expression des MHC I bei HPV-assoziierten und HPV-negativen Oropharynxkarzinomen verglichen werden. Weiterhin soll überprüft werden ob Unterschiede im Überleben in Abhängigkeit des MHC I Verlustes und der Anwesenheit aktiver zytotoxischer Zellen bestehen. Typische Risikofaktoren beim Oropharynxkarzinom wie Nikotin- und Alkoholkonsum sollen ebenfalls in eine multivariate Analyse einbezogen werden. So sollen mögliche Gründe für die Unterschiede im Überleben dargestellt werden, die durch eine veränderte Immunantwort bei positivem HPV-Status getriggert sein könnten.

2. Material und Methodik

2.1 Das Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv dieser Arbeit wurde aus dem Gesamtkollektiv der HNO-Tumorforschung der Klinik für HNO-Heilkunde, Kopf- Halschirurgie des UKGM Gießen ausgewählt. Dieses bestand zum Zeitpunkt der Arbeit aus insgesamt 364 Patienten, bei denen im Zeitraum zwischen dem 01.01.2000 und dem 23.12.2009 ein Oropharynxkarzinom diagnostiziert wurde. Im Rahmen vorangegangener Arbeiten wurden, nach entsprechender Zustimmung der Patienten, allgemeine Patientendaten (Geschlecht, Alter der Patienten, Diagnosezeitpunkt) sowie Daten zum Tumor nach dem TNM-System erfasst. Es erfolgte zusätzlich die Einteilung in die UICC-Stadien gemäß den Kriterien des *„American Joint Committee of Cancer"* von 2002. Weiterhin wurden der Alkohol- und Tabakkonsum erfasst, sowie der Leistungszustand der Patienten gemäß dem *„Eastern Cooperative Oncology Group-Score"* (ECOG) bewertet [65]. Ein regelmäßiger Alkoholkonsum wurde als Aufnahme von ≥2 Standardgläsern Alkohol pro Tag (1 Standardglas ≙ 12g Alkohol) definiert [34]. Als Raucher wurden Patienten definiert, die einen Konsum von ≥3 Zigaretten pro Tag angegeben hatten. Das Therapieschema wurde in palliativ und kurativ unterschieden. Die palliative Therapie umfasste eine alleinige Chemotherapie. Eine kurative Therapie war als adjuvante oder neoadjuvante Radiatio mit oder ohne Chemotherapie definiert. In Zusammenarbeit mit der Abteilung für angewandte Tumorbiologie des Universitätsklinikums Heidelberg wurden die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Inzisions- bzw. Exzisionsproben des Tumorgewebes auf das Vorhandensein des humanen Papillomvirus hin untersucht.

Aus dem Gesamtkollektiv wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Patienten mit einem HPV-assoziierten Tumor ausgewählt (n=72). Korrespondierend zu jedem dieser Fälle wurde anschließend aus den Patienten mit HPV-negativen Tumoren nach den folgenden Kriterien *„matched pairs"* gebildet: Geschlecht, Alter und UICC-Stadium (Tab. 1). Daraus entstand das hier verwendete Patientenkollektiv (n=144). Das Patientenalter lag in diesem selektierten Kollektiv im Durchschnitt bei 60,04 Jahren (SD 10,75 Jahre, 95%-KI untere 57,7 obere 62,3). Zu den in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten wurden die entsprechenden FFPE-Tumorproben herausgesucht, aufgearbeitet und immunhistochemisch angefärbt. Der Verwendung dieser Proben wurde von der

Ethikkommission am 14.07.2011 und 15.12.2011 (Aktenzeichen 151/11 und 296/11) zugestimmt.

Tab. 1: Deskriptive Analyse des Patientenkollektivs

		HPV assoziiert	HPV negativ	gesamt
Geschlecht	weiblich	18	17	35
	männlich	54	55	103
Alter	jung (<60 Jahre)	37	39	76
	alt (≥60 Jahre)	35	33	68
UICC-Stadium	I	4	5	9
	II	5	7	12
	III	18	18	36
	IV	44	42	86

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Zur Vorbereitung der Tumorpräparate, Durchführung der immunhistochemischen Färbung sowie anschließenden Auswertung wurden die folgenden Geräte verwendet (Tab. 2).

Tab. 2: Verwendete Geräte

		Hersteller	Modell-Nr.
Lichtmikroskop	DMI3000B	Leica	11888380
Mikrowelle	R-240W	Sharp	100701064
PAP-Stift	PAP pen-immun	Sigma Aldrich	1001419477
Schlittenmikrotom	SM 2010 R	Leica	1492010RUEL
Schüttler	Mini Blot Mixer	VWR	95057-436
Trockenschrank	ED53	Binder	9010-0333
Vortexer	Lab dancer	IKA	3365000
Wasserbad	Paraffin-Streckbad	GFL	GFL_20013
Zentrifuge	Sprout	Heathrow Scientific LLC	120301

2.2.2 Chemikalien

Für die immunhistochemische Färbung der Tumorpräparate wurden die folgenden kommerziell erhältlichen Chemikalien verwendet (Tab. 3).

Tab. 3: Verwendete Chemikalien

	Hersteller	Bestell-Nr.
BSA	Sigma-Aldrich	A7030-10G
$CoCl_2$	Sigma-Aldrich	C8661-25G
Ethanol absolut	Otto Fischer	27690
H_2O_2	AppliChem	A1134,0250
Hämalaun	Carl Roth	T865.1
HCl	Sigma-Aldrich	H 1758
Horse Serum 100%	Santa Cruz Biotechnology, inc.	sc-2483
KCl	AppliChem	A2939.1000
KH_2PO_4	AppliChem	A1043.0500
Methanol	AppliChem	A3493
Na_2HPO_4	AppliChem	A2944.0500
NaCl	AppliChem	A2942.1000
Roti®-Histokitt II	Carl Roth	T160.1
Target Retrival Solutions (pH6)	DAKO	S169984
Tris	AppliChem	A3452.1000
Tween 20	AppliChem	A4974.0250
Xylol	Carl Roth	CN80.1

2.2.3 Puffer

In der vorliegenden Arbeit wurden die Puffer PBS 10x, TBS 10x sowie TBST 10x in der jeweils unten angegebenen Zusammensetzung verwendet (Tab. 4).

Tab. 4: Verwendete Puffer

		Menge	Hersteller	pH-Wert
PBS 10x	NaCl	80g	AppliChem	7,4
	Na_2HPO_4	7,2g	AppliChem	
	KCl	2g	AppliChem	
	KH_2PO_4	4,8g	AppliChem	
	ddH_2O	ad 1l ddH_2O	Hauseigene Reinstwasseranlage (Millipore)	
TBS 10x	HCl	(mit 10% oder höher konzentriertem HCl titrieren)	Sigma-Aldrich	7,4
	NaCl	40g	AppliChem	
	Tris	12,1g	AppliChem	
TBST	Tween 20	500µl	AppliChem	
	TBS 10x	50ml	-	
	ddH_2O	ad 500ml ddH_2O	Hauseigene Reinstwasseranlage (Millipore)	

2.2.4 Kit-Systeme

In der vorliegenden Arbeit wurden die Kit-Systeme: „*ImmPress™ Reagent Kit Anti-rabbit"* sowie „*Anti-mouse Ig*" von Vector Laboratories, das „*2-Solutions DAB Kit*" von Invitrogen sowie das „*NovaRED Peroxidase Kit*" ebenfalls von Vector Laboratories für die Immunhistochemie verwendet (Tab. 5).

Tab. 5: Verwendete KIT-Systeme

		Hersteller	Katalog-Nr.
ImmPress™ Reagent Kit (Anti-rabbit Ig)	ImmPRESS™ (Peroxidase) Polymer Anti-Rabbit IgG Reagent (made in horse, ready-to-use) 2.5% Normal Horse Serum for blocking (ready-to-use)	Vector Laboratories Inc.	MP-7401
ImmPress™ Reagent Kit (Anti-mouse Ig)	ImmPRESS™ (Peroxidase) Polymer Anti-Mouse IgG Reagent (made in horse, ready-to-use) 2.5% Normal Horse Serum for blocking (ready-to-use)	Vector Laboratories Inc.	MP-7402
2-Solution DAB Kit	DAB Substrate Buffer (ready-to-use) DAB Chromogen	Invitrogen by life technologies	88-2014
NovaRED Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Reagent 1 Reagent 2 Reagent 3 Hydrogen Peroxid Solution	Vector Laboratories Inc.	SK-4800

2.2.5 Antikörper

Für die immunhistochemische Färbung der Tumorschnitte wurden der Anti-GZMB Antikörper von Sigma-Aldrich sowie der „L368 Anti-b2M Antikörper“ verwendet (Tab. 6) [46]. Der Antikörper „L368“ wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Magnus von Knebel-Doeberitz aus dem Institut für Pathologie der Abteilung für angewandte Tumorbiologie des Universitätsklinikums Heidelberg bereitgestellt.

Tab. 6: Verwendete Primärantikörper

		Lagerung	Hersteller	Bestell-Nr.
GZMB	rabbit	-20°C	Sigma-Aldrich	HPA003418-100UL
L368 (b2M)	mouse	4°C	nicht komerziell erhältlich	-

2.3 Methodik

2.3.1 Bestimmung des HPV-Status

Der HPV-Status wurde von Mitarbeitern der Abteilung für angewandte Tumorbiologie des pathologischen Instituts der Universität Heidelberg gemäß einer Vorarbeit von Prigge et al. (2015) retrospektiv erhoben: Die HPV-DNA wurde mithilfe des „*DNeasy Blood & Tissue Kit*“ (Qiagen, Hilden, Germany) aus den FFPE Schnitten extrahiert [73]. Anschließend wurde das „*Multiplex HPV Genotyping Kit for Research in Epidemiology*“ (Multimetrix, Heidelberg, Germany) verwendet um die DNA von 15 „*high risk*“ Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, und 82), dreier mutmaßlicher „*high risk*“ Typen (26, 53, und 66) sowie sechs „*low risk*“ Typen (6, 11, 42, 43, 44, und 70) mittels multiplexer Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) zu identifizieren. Es wurde die p16INK4a Expression im Kern sowie im Zytoplasma untersucht [98]. Es wurde davon ausgegangen, dass eine HPV induzierte Karzinogenese stattgefunden hat, wenn sowohl „*high risk*“-DNA nachweisbar ist als auch in mind. 70% der Tumorzellen eine p16 Expression aufweisen. In der Literatur wir die Kombination aus Gennachweis mittels PCR und immunhistochemischen Nachweis von p16INK4a als sicherer Nachweis für eine HPV-Infektion angesehen [72, 84]. Da die Einteilung in HPV-assoziierte und HPV-negative Tumoren retrospektiv erfolgte, hatte diese keine Auswirkung auf das Behandlungsschema der Patienten.

2.3.2 Immunhistochemie

2.3.2.1 Anfertigung der Gewebeschnitte

Die Paraffinblöcke wurden mithilfe des Schlittenmikrotoms (SM 2010 R) von Leica in eine Dicke von 3µm geschnitten. Es wurden von jeder Tumorprobe zwei Gewebeschnitte angefertigt, die auf jeweils einen Objektträger aufgetragen wurden. Die Paraffin-Schnitte wurden zum Strecken im Wasserbad (Hersteller GFL) auf eine mit 37°C temperierte Wasseroberfläche gelegt und auf die Glasobjektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 37° im Trockenschrank (Firma Binder) getrocknet.

2.3.2.2 Entparaffinieren und blocken unspezifischer Bindungsstellen

Zunächst wurde das Paraffin aus den Schnitten entfernt. Hierfür wurden die Schnitte in einer Färbeküvette zweimal jeweils 10min in Xylol gestellt. Anschließend wurde mit der Re-Hydrierung der Schnitte begonnen. Für jeweils zweimal fünf Minuten wurden die Schnitte der Alkoholreihe zugeführt. Diese war in absteigender Reihenfolge der Konzentrationen angeordnet: Ethanol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 70%. Zuletzt wurden die Schnitte in VE H_2O gewaschen.

Analog dem üblicherweise verwendeten Citratpuffer wurde „*Target Retrieval Solution*“ (pH6) von DAKO verwendet, um die Antigene zu renaturiern. Die Schnitte wurden hierzu in einer Färbeküvette mit „*Target Retrieval Solution“* platziert und diese bei 60% Leistung für vier Minuten in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Für weitere 15min wurden die Schnitte bei 10% Leistung in der Mikrowelle belassen. Anschließend kühlten die Schnitte für 20min ab, bevor sie zweimal kurz in VE H_2O gewaschen wurden.

Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu hemmen, wurden die Schnitte 20min in einem Gemisch aus 2ml Wasserstoffperoxid und 98ml Methanol bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in VE H_2O wurde eine hydrophobe Barriere mithilfe eines „*PAP pen*“ aufgebracht und die Schnitte für zwei Minuten mit PBS gespült.

Nach 40minütiger Inkubation bei RT mit 2% BSA in TBST, sowie einem anschließenden Waschvorgang mit TBST wurde auf jeweils einen der beiden Gewebeschnitte der Primärantikörper aufgetragen.

2.3.2.3 Primärantikörper (Anti-GZMB)

Es sollten jeweils auf einem Objektträger die Färbung des GZMB sowie eine „Doppelfärbung“ von GZMB und b2M verglichen werden. Daher wurden zuvor jeweils zwei Parrafinschnitte auf einen Objektträger aufgetragen. Zur Durchführung der „Doppelfärbung“ wurde der Primärantikörper anti-GZMB in einer Verdünnung von 1:150 mit 1% BSA in TBST appliziert. Um möglichst geringe Antikörpermengen (ca. 35µl/Schnitt) verwenden zu können, wurde eine Folie zugeschnitten und aufgelegt. Der jeweils andere Parrafin-Schnitt wurde zunächst ohne Antikörperapplikation

mitgeführt und mit 1% BSA in TBST bedeckt, um ein austrockenen während der Inkubationszeit (90min bei RT) zu verhindern.

Bevor der Sekundärantikörper („*ImmPress Peroxidase rabbit*“) aufgetragen wurde, sind die Schnitte zweimal 5min mit TBST gespült worden. Die Inkubationszeit des Sekundärantikörpers betrug 30min bei RT gemäß den Herstellerangaben. Auf erneutes Waschen der Schnitte mit VE H_2O folgte die Detektion mithilfe des Färbe-Kit Systems „*NovaRed*“ von Vector Laboratories Inc.. Die Färbelösung wurde für 14min bei RT auf den Schnitten belassen, bevor die Färbung durch Waschen in VE H_2O abgestoppt wurde.

2.3.2.4 Primärantikörper (Anti-GZMB, Anti-B2M)

Um den zweiten Primärantikörper applizieren zu können wurden die Schnitte zunächst für 20min mit 10% „*Horse Serum*“ in PBS geblockt, worauf ein weiterer Waschschritt mit TBST folgte.

Der anti-b_2M Primärantikörper L368 wurde in einer Verdünnung von 1:100 mit 1% „*Horse Serum*“ in PBS auf den bereits gefärbten Schnitt appliziert. Zu dem noch ungefärbten Schnitt des Objektträgers wurde der anti-GZMB Primärantikörper hinzugegeben (Verwendung wie unter 2.3.2.3 beschrieben). Auch hier wurde eine Folie auf den Schnitt aufgelegt um eine Austrocknung während der Inkubation über Nacht bei 4°C zu verhindern.

Vor jedem der folgenden Schritte wurde ein Waschschritt mit TBST durchgeführt. Der Sekundärantikörper („*ImmPress mouse*“ bzw. „*rabbit*“) wurde für 30min bei RT inkubiert. Anschließend folgte die Detektion mithilfe der Färbe-Kit Systeme „*2-Solution DAB*“ für den Antikörper L368 sowie „*NovaRed*“ für den anti-GZMB Antikörper (Verwendung wie unter 2.3.2.3 beschrieben). Um mit dem DAB-Kit eine blau-grau-Färbung zu erzielen, wurde in einem Verhältnis von 1:20 Cobaltchlorid hinzugefügt. Das DAB-Gemisch inkubierte 2,5min bei RT bevor die Färbung mit Leitungswasser abgestoppt wurde.

2.3.2.5 Kernfärbung

Zur leichteren Auswertbarkeit der Immunhistochemie unter dem Mikroskop und zur besseren Identifikation von Tumorzellen, wurden die Kerne der Zellen angefärbt. Ziel war hierbei eine vergleichsweise schwache Anfärbung zu erzielen, um potenzielle Signale im Zellkern nicht zu überdecken. Dazu wurden die zuvor entparaffinierten und mit Hilfe der entsprechenden Antikörper angefärbten Schnitte für 20sek in einer Färbeküvette mit Hämalaunlösung platziert. Darauf folgte das „Bläuen“ der Schnitte für 10min in leicht fließendem, kaltem Leitungswasser.

2.3.2.6 Dehydrierung und Eindeckung

Nach dem Färbevorgang wurden die Schnitte zur Konservierung dehydriert und mit einem Deckglas versehen. Dazu wurde ein Wasserentzug der Schnitte mithilfe der in Abschnitt 2.3.2.2 erwähnten Alkoholreihe durchgeführt. Die Schnitte wurden in einer Färbeküvette für jeweils zweimal eine Minute in aufsteigender Alkoholkonzentration platziert: 70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol.

Anschließend wurden die Schnitte für jeweils zweimal drei Minuten in Xylol inkubiert. Als Eindeckmedium wurde „Roti®-Histokitt II“ von Carl Roth GmbH + Co. KG verwendet.

2.3.3 Auswertung der Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung der Tumorproben wurde mikroskopisch ausgewertet. Um die Reproduzierbarkeit der Färbung zu kontrollieren, wurde bei jeder Färbung ein Probeschnitt als Positivkontrolle mitgeführt, von dem ein starkes Signal bekannt war. Der HPV-Status der Tumorprobe war dem Auswerter zum Zeitpunkt der Auswertung nicht bekannt.

Die Zellkerne wurden mit einer Hämalaunlösung nach Mayer angefärbt. Entsprechend konnte anhand der bläulichen Kernfärbung zwischen Tumorgewebe und Stroma unterschieden werden. Der immunhistochemische Nachweis des GZMB und b2M erfolgte durch eine indirekte Färbung. Es wurde zunächst der spezifische

Primärantikörper L368 (b2M) bzw. Anti-GZMB auf den Schnitt aufgetragen, der an das jeweilige Antigen gebunden hat. An diesen Primärantikörper hat anschließend der Sekundärantikörper des „*ImmPress™ Reagent Kit“* (*Anti-rabbit Ig* bzw. *Anti-mouse Ig*) gebunden. Um die Färbereaktion zu induzieren, wurden das „*2-Solution DAB Kit“* sowie das „*NovaRed Peroxidase (HRP) Substrate Kit“* verwendet. Entsprechend den jeweiligen Datenblättern konnte auch in dieser Arbeit eine braun-gräuliche randständige Färbung des b2M sowie eine rote Färbung der GZMB-Granula beobachtet werden. Das Präparat P294 zeigte jedoch keine adäquate Färbung des b2M und konnte daher nicht in alle Analysen eingeschlossen werden.

Der „b2M-Verlust“ des Tumorgewebes wurde in vier Kategorien unterteilt: 0-20%, 21-50%, 51-80% sowie 81-100% der Tumorfläche mit reduzierter Färbung der Zellgrenzen (Abb. 7 und 8). Jeder Gewebeprobe wurde so eine Kategorie zugeteilt. Kriterium war hier die eindeutig randständige graubraune Färbung der Tumorzellen. Betrachtet wurden vornehmlich die Tumorränder, um möglichst wenig nekrotische Tumorflächen einzubeziehen. Bei einem beginnenden Zellzerfall wurde eine verminderte Färbung beobachtet, sodass diese Flächen aus der Bewertung rausgefallen sind (Abb. 8). Das umliegende Stroma wurde nicht bewertet.

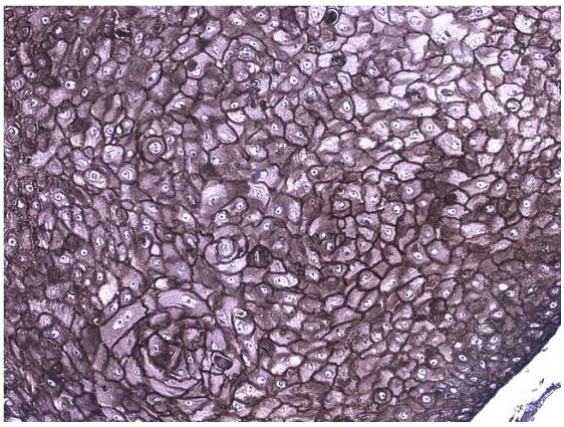


Abb. 7 Präparat P002, 40x Objektiv: Die randständige Färbung der Tumorzellen stellt den nahezu vollständigen Erhalt des b2M auf der Zelloberfläche dar.

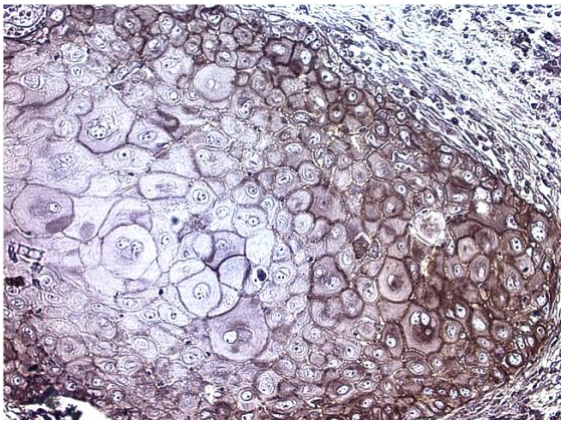


Abb. 8 Präparat P023, 40x Objektiv: Über die Hälfte der Tumorzellen weist keine randständige Färbung der Zellmembran, sondern lediglich die Kernfärbung auf.

Die mit GZMB gefärbten Zellen wurden in einem Rastersystem nach dem folgenden Schema ausgezählt:

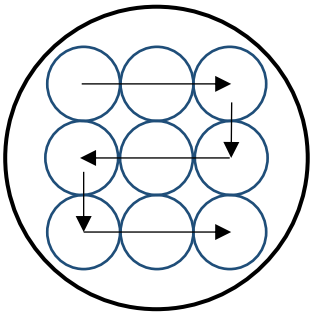


Abb. 9 Zählschema der immunhistochemisch angefärbten zytotoxischen Zellen: Die Auszählung der Zellen erfolgte bei Verwendung des 40x-Objektivs in einem Rasterschema von jeweils drei mal drei Sichtfeldern im Stroma und im Tumorgewebe.

Wie in Abb. 9 gezeigt, wurden bei 40-facher Vergrößerung jeweils dreimal drei Sichtfelder im Tumorgewebe sowie Stroma betrachtet. Dies wurde an jeweils drei Stellen des Gewebeschnittes durchgeführt, sodass insgesamt 54 Sichtfelder in die Auswertung einbezogen wurden. War eine Gewebeprobe zu klein für die 54 Sichtfelder, wurde der komplette Schnitt ausgezählt und die Zahl der gefundenen Zellen jeweils durch die betrachteten Sichtfelder dividiert. Für jede Gewebeprobe konnte so die Zellzahl pro *„high power field*“ berechnet werden.

Sowohl im Tumorgewebe (Abb. 10 A und B) als auch im Stroma (Abb. 11) konnten rot angefärbte Granula einer GZMB positiven Zelle dargestellt werden.

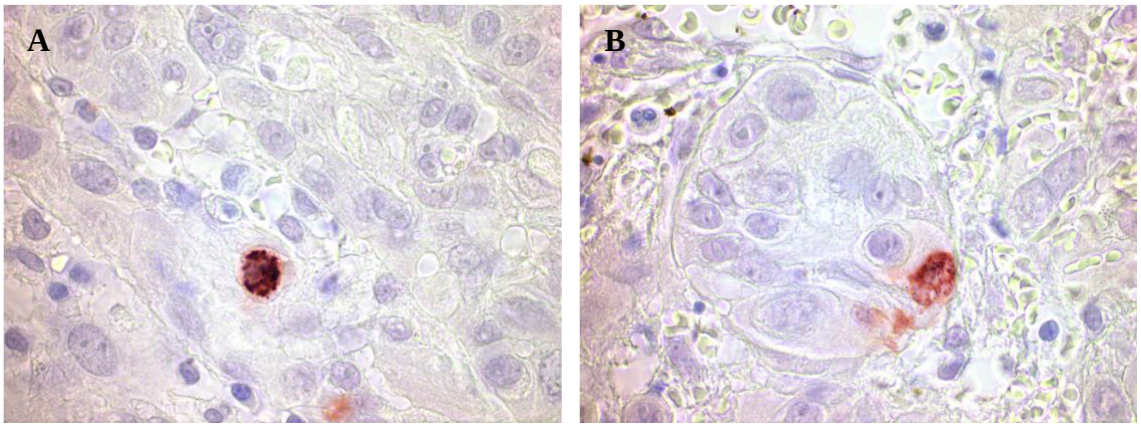


Abb. 10 Präparat P044, 100x Objektiv: Die Abbildungen (A) und (B) zeigen die immunhistochemische rot angefärbten typischen Granula einer Granzym B+ Zelle im Tumorgewebe.

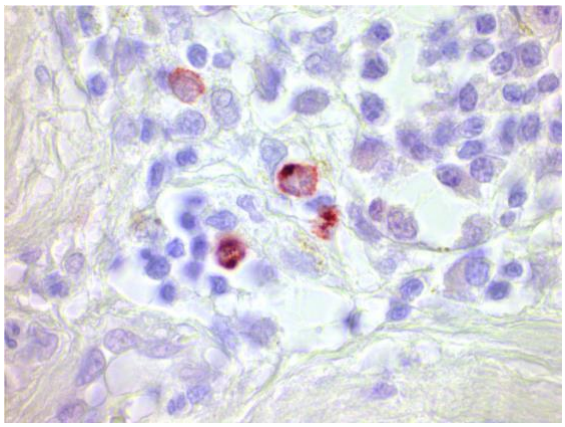


Abb. 11 Präparat P096, 100x Objektiv: immunhistochemische Anfärbung mehrerer Zellen im Stroma, welche Granzym B haltige Granula enthalten.

2.3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung dieser Arbeit erfolgte mit der 22. Version des Statistikprogrammes SPSS von IBM, sowie mit Microsoft Excel 2010 von Microsoft Corporation. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% ($p \leq 0{,}05$) festgelegt. Zur Hypothesentestung wurden in Abhängigkeit der Stichprobengröße folgende Test verwendet: war der Erwartungswert ≥5 jeder Zelle einer Kreuztabelle, erfolgte die Analyse des statistischen Zusammenhangs der Variablen mittels „Pearson Chi-Quadrat-Test“ (asymptotische Signifikanz, zweiseitig) [70]. Kreuztabellen mit geringeren Erwartungswerten wurden mit dem „Exakten Test nach Fisher“ (exakte Signifikanz, zweiseitig) ausgewertet.

Zur graphischen Darstellung des Überlebens der Patienten wurden „Kaplan-Meier“ Kurven erstellt und nach dem Log-Rank-Test (Mantel-Cox) ausgewertet [41]. Dabei wurden zensierte Fälle nicht dargestellt. Zur Berechnung der Überlebensunterschiede wurden alle vorhandenen Überlebensdaten verwendet. In der graphischen Darstellung wurden jedoch nur die Daten bis 10 Jahre nach Diagnosestellung abgebildet. Weiterhin wurden multivariate Analysen nach dem COX-Modell durchgeführt [16]. Dabei gilt die jeweils erste Kategorie als Referenzkategorie. Die graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilungen erfolgte mit gruppierten Balkendiagrammen, die in Microsoft Excel erstellt wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Das Gesamtkollektiv und der HPV-Status

3.1.1 Überleben der Patienten im Gesamtkollektiv

Das Patientenkollektiv dieser Arbeit umfasst 144 Patienten. Dabei wurden, wie in Abschnitt 2.1 erläutert, zu allen Fällen bei denen zwischen dem 01.01.2000 und dem 23.12.2009 ein HPV-assoziiertes Oropharynxkarzinom diagnostiziert wurde (n=72) *„matched pairs“* gebildet. Das Patientenalter des Gesamtkollektivs liegt im Durchschnitt bei 60 Jahren (SD 10,75 Jahre, 95%-KI untere 57,7 obere 62,3). Das 5-Jahresüberleben liegt bei 57,6% (Abb. 12).

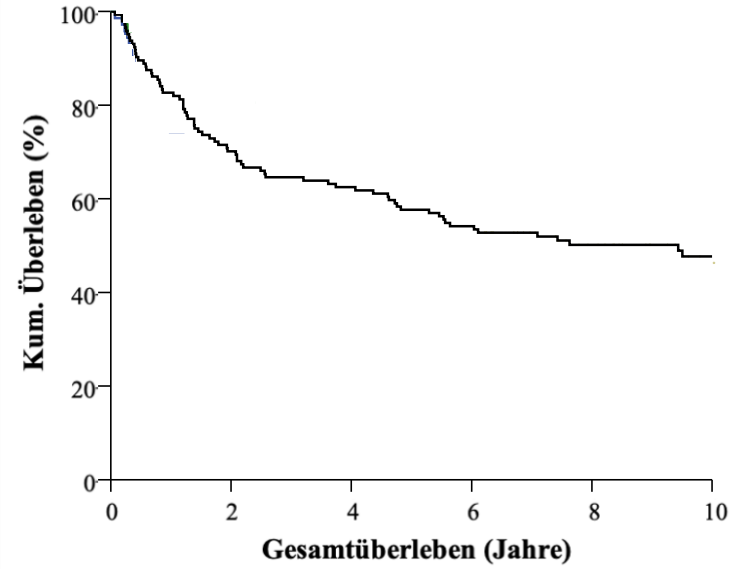


Abb. 12 Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs (n=144): Das 5-Jahresüberleben liegt bei 57,6% (zensierte Fälle nicht dargestellt).

3.1.2 Überleben der Patienten nach dem HPV-Status aufgetrennt

In der Literatur wird eine Assoziation zwischen dem positiven HPV-Status und einem längeren Überleben, im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativen Tumoren beschrieben. Auch das in dieser Arbeit ausgewertete Patientenkollektiv zeigt abhängig vom HPV-Status einen statistisch signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben (Abb. 13). Das 5-Jahresüberleben liegt mit 76,4% bei Patienten mit HPV-assoziierten OSCC deutlich höher gegenüber 38,9% bei negativem HPV-Status (p<0,001).

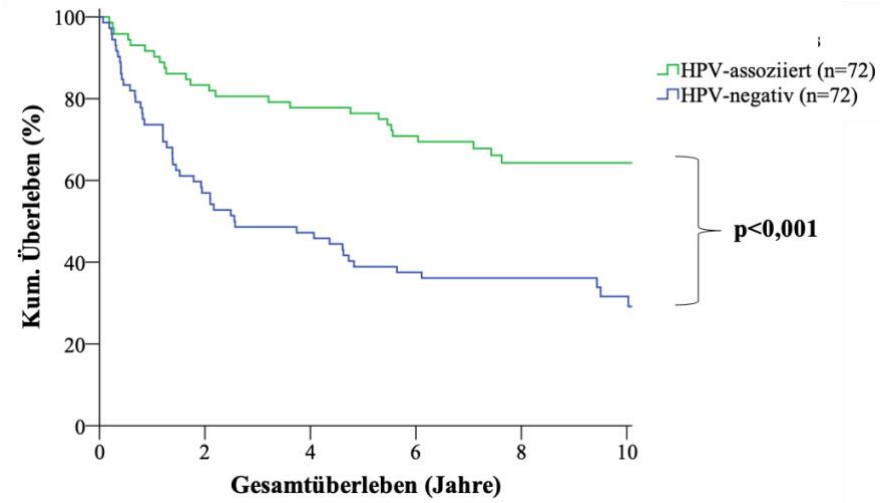


Abb. 13 Gesamtüberleben stratifiziert nach dem HPV-Status (n=144): Die Überlebensrate ist bei Vorliegen eines HPV-assoziierten Oropharynxkarzinoms höher (p: p-Wert (Log-Rank-Test)).

3.2 Beta-2-Mikroglobulin

3.2.1 Verteilung des B2M-Verlustes im Gesamtkollektiv

Für die Analyse des b2M-Verlustes wurde wie in Abschnitt 2.3.4.1 beschrieben vorgegangen. Die Präparate wurden gemäß der immunhistochemischen Auswertung der b2M-Expression folgenden Gruppen zugeteilt: 1-20%, 21-50%, 51-80% sowie 81-100% der Tumorfläche mit reduzierter oder fehlender b2M-Expression. Es ergab sich die im Folgenden abgebildete Gruppenverteilung im Gesamtkollektiv (Abb. 14): 51 der ausgewerteten Tumorschnitte wurden der Kategorie „b2M-Verlust auf 81-100% der Tumorfläche“ zugeordnet. Somit bildet diese mit ca. 36% des Gesamtkollektivs die größte Gruppe. In abnehmender Häufigkeit folgen die Gruppen 51-80% b2M-Verlust (37 Fälle, 26% des Gesamtkollektivs), 21-50% b2M-Verlust (32 Fälle, ca. 22% Gesamtkollektivs) und 1-20% b2M-Verlust (23 Fälle, 16% des Gesamtkollektivs) (Abb. 14).

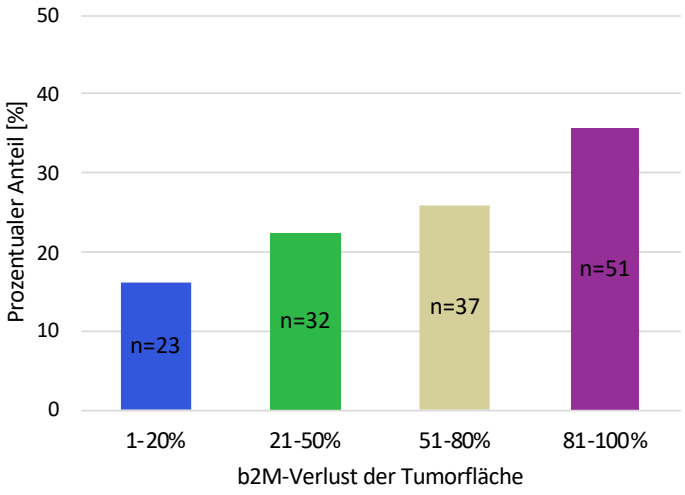
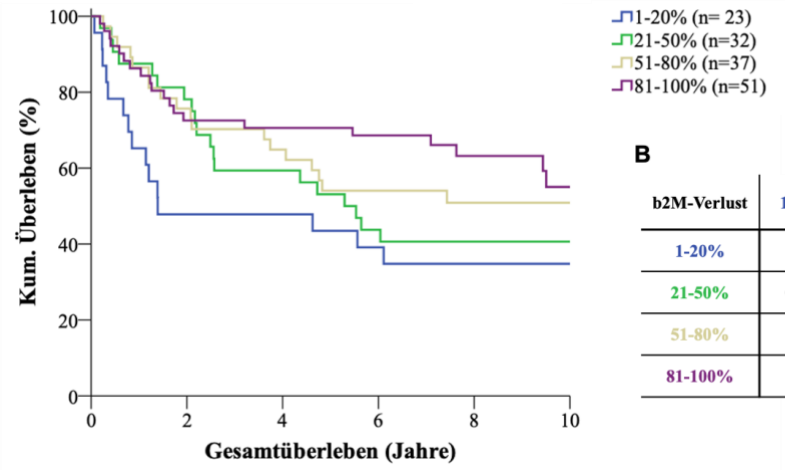


Abb. 14 Verteilung des b2M-Verlustes auf der Tumorfläche der auswertbaren Fälle (n=143): In 51 der ausgewerteten immunhistochemischen Färbungen liegt ein b2M-Verlust von 81-100% der Tumorfläche vor.

3.2.2 Überleben der Patienten nach dem b2M-Verlust aufgetrennt

Die Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten erfolgte nach dem b2M-Verlust aufgetrennt. Die graphische Darstellung der Überlebenskurven (Abb. 15 A) zeigt einen signifikanten Unterschied (p=0,011) zwischen der Gruppe mit einer nahezu „normalen“ b2M-Expression (b2M-Verlust 1-20%) und der mit einem nahezu vollständigen Verlust des b2M (81-100%) (Abb. 15 B). Die beiden Gruppen mit einem b2M-Verlust zwischen 21% und 80% zeigen hingegen zu keiner der anderen Gruppen einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben. Das 5-Jahresüberleben liegt bei einer „normalen“ b2M-Expression bei 43,5%, wohingegen das 5-Jahresüberleben in der Gruppe mit einem fast vollständigen b2M-Verlust bei 70,6% liegt.

A



B

b2M-Verlust	1-20%	21-50%	51-80%	81-100%
1-20%	-	0,333	0,111	**0,011**
21-50%	0,333	-	0,494	0,087
51-80%	0,111	0,494	-	0,336
81-100%	**0,011**	0,087	0,336	-

Abb. 15 Gesamtüberleben der auswertbaren Fälle, stratifiziert nach dem b2M-Verlust (n=143): (A) Die Überlebensrate der Patienten ist bei einem immunhistochemischen Nachweis eines nahezu vollständigen b2M-Verlustes (>80%) höher als bei einer „normalen“ b2M-Expression b2M-Verlust ≤ 20%). (B) p-Werte der Vergleiche in A (Log-Rank-Test).

3.2.3 Assoziation des b2M-Verlustes und des HPV-Status

Um einen möglichen, vom HPV-Status abhängigen Einfluss der b2M-Expression auf das Patientenüberleben zu untersuchen, wurde die Verteilung der zuvor gebildeten vier Gruppen nach dem HPV-Status aufgetrennt betrachtet (Abb. 16). Dabei zeigte die Gruppenverteilung einen statistisch signifikanten Unterschied ($p<0,001$). Bei einem positiven HPV-Status besteht in 56% der Fälle ein nahezu vollständiger b2M-Verlust (81-100%) im Tumorgewebe. Ein b2M-Verlust von 81-100% zeigt sich bei HPV-negativen Oropharynxkarzinomen mit 15% deutlich seltener. Insgesamt ergibt sich bei einem negativen HPV-Status eine verhältnismäßig gleichmäßige Verteilung der Klassen des b2M-Verlustes.

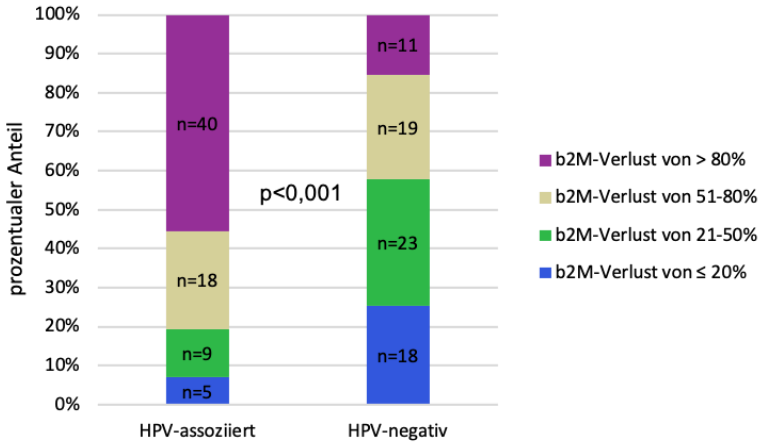


Abb. 16 Verteilung des b2M-Verlustes der auswertbaren Fälle, nach dem HPV-Status aufgetrennt (n=143): In der immunhistochemischen Färbung zeigen HPV-assoziierte Oropharynxkarzinome häufiger einen b2M-Verlust. p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test)

In der weiteren Auswertung wurde die Variable „b2M-Verlust“ an verschiedenen „*cutoff*“ Grenzwerten dichotomisiert. Entsprechend der zuvor ausgewerteten Gruppen wurden die *cutoff*-Werte bei 20%, 50% sowie 80% festgelegt und die Verteilung der Fälle in Bezug auf den HPV-Status getestet. Unabhängig von der Wahl des *cutoff*-Wert zeigen HPV-assoziierte Oropharynxkarzinome in allen drei Auswertungen signifikant häufiger einen Verlust des b2M (Abb. 17 A-C). Bei einem negativen HPV-Status hingegen, liegt häufiger eine normale Expression des b2M bzw. lediglich ein marginaler b2M-Verlust vor.

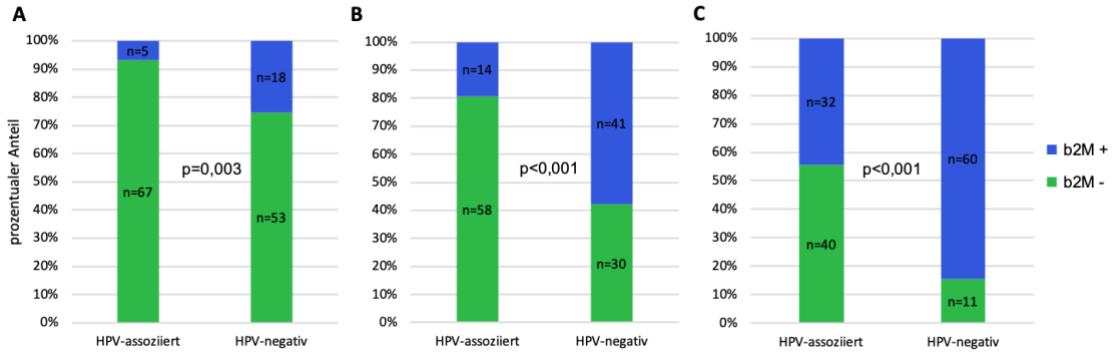


Abb. 17 Häufigkeitsverteilung des b2M-Verlustes der auswertbaren Fälle bei HPV-assoziierten und HPV-negativen OSCC, aufgetrennt nach verschiedenen *cutoff*-Werten (n=143): (A) Bei einem *cutoff*-Wert von 20% weisen HPV-assoziierte Oropharynxkarzinome häufiger einen immunhistochemischen Verlust des b2M als HPV-negative OSCC auf. Auch bei einem *cutoff-Wert von* 50% (B) und einem *cutoff*-Wert von 80% (C) zeigen HPV-assoziierte OSCC häufiger einen Verlust des b2M. p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test). („b2M -“ b2M-Verlust, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression)

Es wurde der *cutoff*-Wert von 50% für alle folgenden Analysen beibehalten, da die Überlebensraten der Untergruppen in Abb. 15 (A) (Abschnitt 3.2.2) auf eine Trennung zwischen gutem und schlechtem Überleben bei einem b2M-Verlust um die 50% hindeuten. Die graphische Darstellung des Gesamtüberlebens (Abb. 18) zeigt ein statistisch signifikant besseres Überleben (p=0,022) bei einem b2M-Verlust von >50%. Das 5-Jahresüberleben liegt bei 49,1% (b2M-Verlust ≤50%) gegenüber 63,6% (b2M-Verlust >50%).

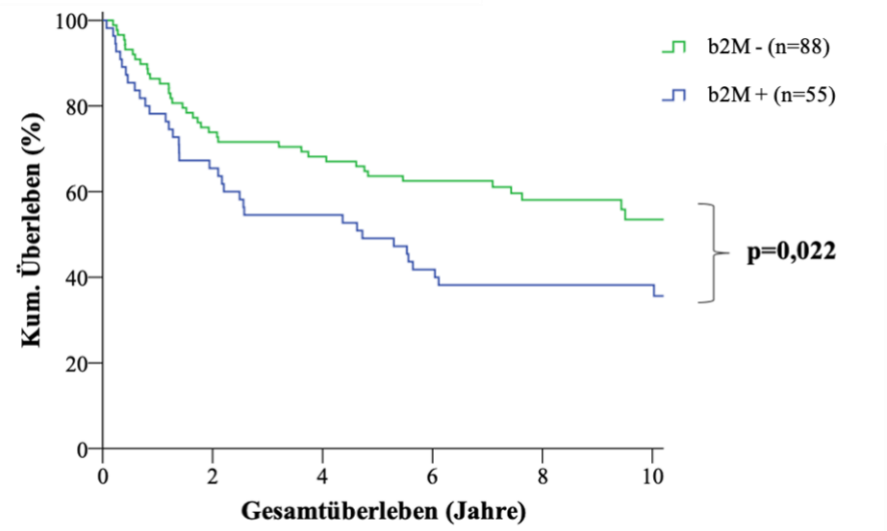


Abb. 18 Gesamtüberleben der auswertbaren Fälle, stratifiziert nach dem b2M-Verlust bei dem *cutoff* 50% (n=143): Es besteht eine höhere Überlebensrate bei einem immunhistochemischen Nachweis eines b2M-Verlustes im Primärtumor von mehr als 50% der ausgewerteten Tumorfläche (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („b2M -“ b2M-Verlust >50%, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression)

Das Gesamtüberleben wurde schließlich nach dem HPV-Status getrennt betrachtet (Abb. 19 A und B), jedoch konnte weder in der Gruppe der HPV-assoziierten (A) noch in der Gruppe der HPV-negativen Oropharynxkarzinome ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben abhängig vom b2M-Verlust abgebildet werden (HPV-assoziiert p=0,733 / HPV-negativ p=0,439).

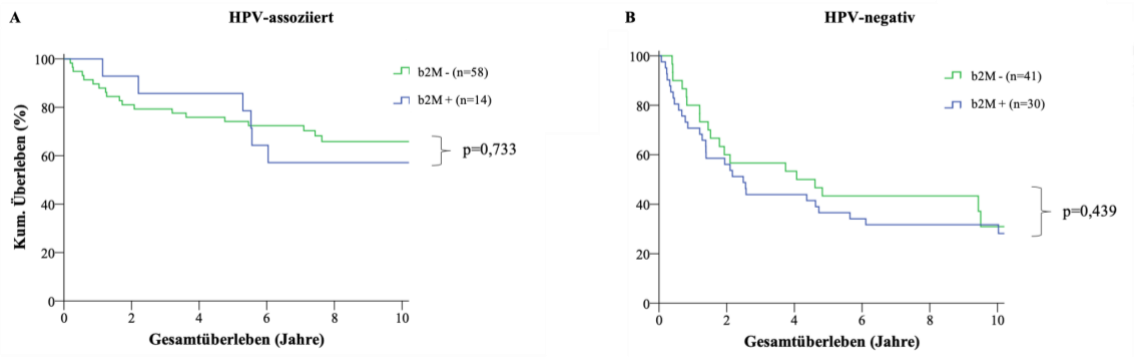


Abb. 19 Gesamtüberleben der auswertbaren Fälle, stratifiziert nach dem b2M-Verlust in HPV-negativen bzw. HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen (n=143): Bei HPV-assoziierten (A) und HPV-negativen OSCC (B) zeigt sich das Patientenüberleben unabhängig von der b2M-Expression (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („b2M -“ b2M-Verlust >50%, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression)

3.2.4 Einfluss des b2M-Verlustes und weiterer Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben – univariate Analyse

Um den Einfluss weiterer Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben zu analysieren, wurde zunächst die Häufigkeitsverteilung der folgenden Risikofaktoren, stratifiziert nach dem b2M-Verlust, mittels Chi-Quadrat-Test ausgewertet (Tab. 7): Alter, ECOG, Alkoholkonsum, Nikotinkonsum sowie die Tumor-Lokalisation und der TNM-Status. Die Variablen UICC-Status sowie der Charlson Komorbiditäts-Index, wurden zunächst ebenfalls untersucht. Da diese jedoch dieselben Merkmale wie der ECOG-Index bzw. die TNM-Klassifikation beschreiben, wurden sie nicht in die weitere Auswertung in Bezug auf das Gesamtüberleben eingeschlossen.

Es zeigte sich lediglich bei dem HPV-Status sowie dem Risikofaktor Alkohol ein statistisch signifikanter Unterschied in der Gruppenverteilung: Patienten mit einem HPV-assoziierten Karzinom weisen einen b2M-Verlust von >50% auf und haben selten einen Alkoholkonsum von >2 Gläsern pro Tag.

Tab. 7: Statistische Auswertung der Risikofaktoren stratifiziert nach dem b2M-Verlust

		Gesamt		b2M-Verlust ≤50%		b2M-Verlust >50%		
		N	%	N	%	N	%	p-Wert
		144	100	55	38,2	88	61,1	
Risikofaktoren								
HPV	negativ	71	49,3	41	57,7	30	42,3	**≤ 0,001**
	assoziiert	72	50,0	14	19,4	58	80,1	
Alter	jung (<60 Jahre)	76	52,8	30	39,5	46	60,5	0,791
	alt (≥60 Jahre)	67	46,5	25	37,3	42	62,7	
ECOG	gesund (0-1)	96	66,7	39	40,6	57	59,4	0,504
	krank (2-4)	46	31,9	16	34,8	30	65,2	
Alkohol	nein	74	51,4	23	31,1	51	68,9	**0,022**
	ja (>2 standard Gläser / Tag)	57	39,6	29	50,9	28	49,1	
Nikotin	nein	25	17,4	6	24,0	19	76,0	0,095
	ja (≥3 Zigaretten /Tag)	112	77,8	47	42,0	65	58,0	
Tumor Charakteristik								
Lokalisation	Tonsille	48	33,3	14	29,2	34	70,8	0,104
	andere als Tonsille	95	66,0	41	43,2	54	56,8	
T-stage	1-2	88	61,1	31	35,2	57	64,8	0,380
	3-4	54	37,5	23	42,6	31	57,4	
N-/M-stage	N0 & M0	29	20,1	8	27,6	21	72,4	0,172
	N>0 , M>0	111	77,1	46	41,4	65	58,6	

signifikante Ergebnisse dick markiert, p-Wert (Log-Rank-Test)

Anschließend wurden alle oben genannten Risikofaktoren auf einen Einfluss auf das Gesamtüberleben hin untersucht (Tab. 8). Die folgenden allgemeinen Faktoren üben einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben aus (Tab. 8 A): ein positiver HPV-Status des OSCC, ein junges Alter, ein ECOG-Status zwischen 0 und 1 sowie ein Alkoholkonsum von ≤2 Standardgläsern. Bezüglich der Tumorcharakteristik sind eine tonsilläre Lokalisation sowie ein niedriges T-Stadium (T 1-2) mit einem besseren Überleben der Patienten assoziiert. Der vollständige b2M-Verlust ist bei jedem der untersuchten cutoff-Werte mit einem besseren Überleben assoziiert (Tab. 8 B).

Tab. 8: Univariate Analyse des Einflusses von Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben

A		medianes Überleben				Überlebensraten			
Allgemeine Risikofaktoren	n	OS [Jahre]	95% CI unterer	95% CI oberer	p-Wert	2J-OS [%] (95%-CI)	5J-OS [%] (95%-CI)	HR (95%CI) Gesamt	p-Wert
HPV									
HPV-negativ	72	2,559	0,204	4,914	**≤ 0,001**	0,556	0,389	1,000	**≤ 0,001**
HPV-assoziiert	72	n.d.	n.d.	n.d.		0,819	0,764	0,367	
Alter									
jung (<60 Jahre)	76	n.d.	n.d.	n.d.	**0,002**	0,763	0,684	1,000	**0,003**
alt (≥60 Jahre)	68	4,610	1,779	7,441		0,618	0,456	2,024	
Geschlecht									
weiblich	35	11,17	2,463	19,877	0,434	0,686	0,629	1,000	0,435
männlich	109	7,094	3,726	10,461		0,688	0,560	1,246	
ECOG									
gesund (0-1)	96	n.d.	n.d.	n.d.	**≤ 0,001**	0,833	0,708	1,000	**≤ 0,001**
krank (2-4)	47	1,386	0,839	1,933		0,383	0,298	2,937	
Alkohol									
nein	74	n.d.	n.d.	n.d.	**≤ 0,001**	0,784	0,730	1,000	**≤ 0,001**
ja (≥ 2 standard Gläser / Tag)	58	2,490	0,449	4,532		0,552	0,397	2,938	
Nikotin									
nein	25	n.d.	n.d.	n.d.	0,188	0,720	0,640	1,000	0,192
ja (≥ 3 Zigaretten / Tag)	112	7,628	3,689	11,567		0,696	0,580	1,594	
Tumor Chrarakteristik									
Lokalisation									
Tonsille	48	n.d.	n.d.	n.d.	**0,002**	0,792	0,771	0,441	**0,003**
andere als Tonsille	96	4,723	2,898	6,549		0,646	0,479	1,000	
T-Status									
1-2	88	n.d.	n.d.	n.d.	**≤ 0,001**	0,852	0,727	1,000	**≤ 0,001**
3-4	55	1,640	0,949	2,331		0,436	0,345	3,587	
N-/M-Status									
N0 & M0	29	n.d.	n.d.	n.d.	0,538	0,724	0,586	1,000	0,539
N>0, M>0	112	7,430	2,835	12,025		0,679	0,571	1,207	

B		medianes Überleben				Überlebensraten			
Spezifische Risikofaktoren	n	OS [Jahre]	95% CI unterer	95% CI oberer	p-Wert	2J-OS [%] (95%-CI)	5J-OS [%] (95%-CI)	HR (95%CI) Gesamt	p-Wert
b_2M									
unvollständiger Verlust (≤20%)	23	1,392	0,000	6,745	**0,029**	0,478	0,435	1,000	**0,032**
vollständiger Verlust (>20%)	120	11,17	n.d.	n.d.		0,742	0,608	0,545	
unvollständiger Verlust (≤50%)	55	4,723	1,606	7,840	**0,022**	0,655	0,491	1,000	**0,023**
vollständiger Verlust (>50%)	88	11,461	n.d.	n.d.		0,727	0,636	0,591	
unvollständiger Verlust (≤80%)	92	5,293	3,884	6,703	**0,039**	0,685	0,511	1,000	**0,042**
vollständiger Verlust (>80%)	51	n.d.	n.d.	n.d.		0,725	0,706	0,587	

signifikante Ergebnisse dick markiert, p-Wert (Log-Rank-Test)

3.2.5 Einfluss des b2M-Verlustes und weiterer Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben – multivariate Analyse

In der multivariaten Analyse wurde untersucht, ob die allgemeinen und spezifischen Risikofaktoren unabhängige Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben sind. In das COX-Modell wurden diejenigen Risikofaktoren eingeschlossen, die in der univariaten Überlebensanalyse (Tab. 8) einen signifikanten Einfluss auf das 5-Jahresüberleben zeigten. Die multivariate Analyse (Tab. 9) zeigt, dass HPV-Status, Alter, ECOG-Status, Alkohol-Konsum sowie T-Stadium als unabhängige Einflussfaktoren angesehen werden können. Im Gegensatz dazu erreicht der b2M-Verlust sowie die Tumorlokalisation in dem multivariaten COX-Modell nicht das Signifikanzniveau, das auf einen unabhängigen Einfluss dieser Faktoren hindeuten würde.

Tab. 9 Multivariate Analyse unter Einbeziehung aller Risikofaktoren mit signifikantem Einfluss auf das Gesamtüberleben nach univ. Analyse (Tab. 8 A und B)

	Gesamtüberleben			
	HR	95% CI		p-Wert
		unterer	oberer	
b2M				
unvollständiger vs. vollständiger Verlust	0,879	0,503	1,537	0,651
HPV-Status				
HPV-negativ vs. HPV-assoziiert	0,385	0,203	0,73	**0,003**
Alter				
jung (<60 Jahre) vs.alt (≥60 Jahre)	2,019	1,213	3,361	**0,007**
ECOG				
gesund (0-1) vs. krank (2-4)	2,418	1,382	4,230	**0,002**
Alkohol				
nein vs. ja	1,876	1,090	3,230	**0,023**
Lokalisation				
andere als Tonsille vs. Tonsille	1,218	0,644	2,305	0,545
T-Status				
1-2 vs. 3-4	2,667	1,528	4,653	**0,001**

signifikante Ergebnisse dick markiert; die jeweils erste Kategorie dient als Referenzkategorie

3.3 Granzym B

3.3.1 Verteilung GZMB+ Zellen im Gesamtkollektiv

Die GZMB+ Zellen wurden nach dem in Abschnitt 2.3.3 beschriebenem Raster ausgezählt. Die Anzahl der im Tumorgewebe ausgezählten Zellen lag zwischen 0 und 3,59 Zellen pro *„high power field"* (HPF) bei einem Median von 0,19 Zellen/HPF. Im Stroma konnten mehr Zellen gefunden werden. Dabei variierte die Anzahl der gezählten Zellen zwischen 0 und 14,59 GZMB+ Zellen pro *HPF* mit einem Median von 0,61 Zellen/HPF. Um einen *cutoff*-Wert festzulegen, wurde von einer Grenze von 2 GZMB+ Zellen im ausgewerteten Gewebeabschnitt ausgegangen. Bei 54 ausgewerteten Sichtfeldern ergab sich der Wert 0,037 welcher auf 0,04 gerundet wurde. Die Variable wurde gemäß dieses *cutoff*-Wertes dichotomisiert und in „GZMB+ Zellen vorhanden" (>0,04 Zellen/HPF) und „keine GZMB+ Zellen vorhanden (≤0,04 Zellen/HPF) klassifiziert (Abb. 20 A und B).

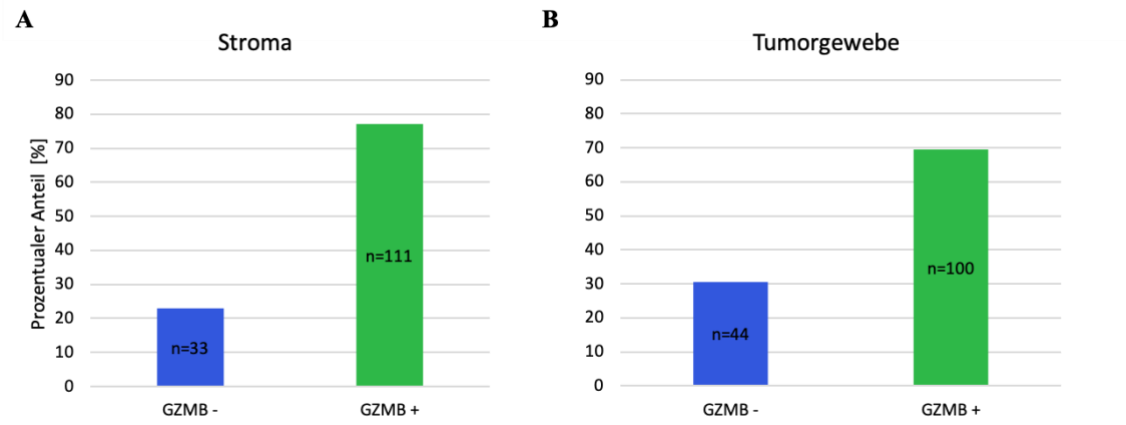


Abb. 20 Verteilung GZMB+ Fälle im Gesamtkollektiv (n=144): Sowohl im Stroma (A) als auch im Tumorgewebe (B) wurden in deutlich mehr Gewebeproben mit GZMB+ Zellen als ohne detektiert. („GZMB -" GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +" GZMB+ Zellen vorhanden)

3.3.2 Überleben der Patienten nach dem GZMB-Status aufgetrennt

Für die Auswertung des Gesamtüberlebens der Patienten wurden zur Vereinfachung die Daten aus dem Stroma und dem Tumorgewebe zu einer Variablen zusammengelegt und beide Gewebeabschnitte zusammen berücksichtigt. Für die Klassifikation wurde der bereits zuvor definierte *cutoff*-Wert von 0,04 Zellen pro HPF verwendet. Mithilfe einer Kaplan-Meier-Analyse wurde das Gesamtüberleben der OSCC-Patienten graphisch dargestellt und nach dem Vorhandensein GZBM+ Zellen aufgetrennt (Abb. 19). Es zeigt sich ein signifikant besseres Patientenüberleben (p=0,044) bei Vorhandensein GZMB+ Zellen. Das 5-Jahresüberleben der Patienten, bei denen GZMB+ Zellen nachgewiesen wurden liegt bei 61,7%, gegenüber 41,4% bei fehlendem Nachweis aktiver zytotoxischer Zellen.

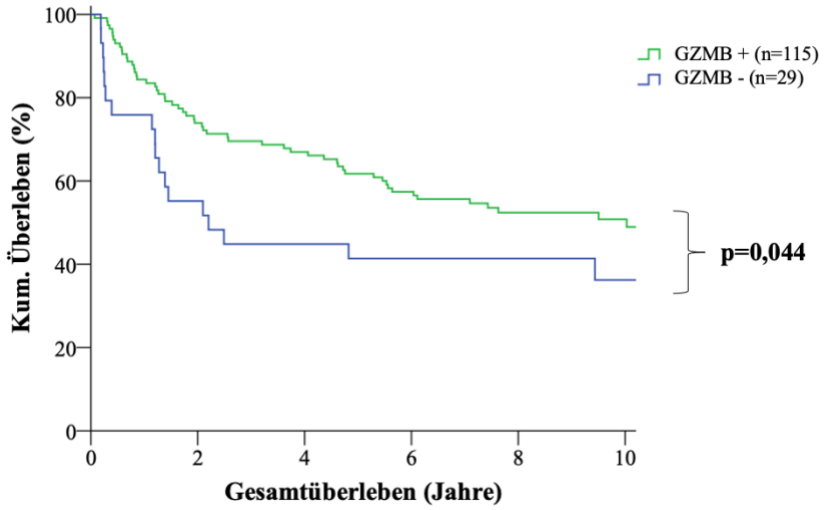


Abb. 21 Gesamtüberleben der Patienten mit OSCC (n=144) stratifiziert nach dem Vorhandensein GZMB+ Zellen: Bei Nachweis GZMB+ Zellen besteht eine signifikant höhere Überlebensrate (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden)

3.3.3 Assoziation des GZMB- und HPV-Status

Die Verteilung der im Tumorgewebe oder Stroma GZMB+ Fälle wurde nach dem HPV-Status aufgetrennt ausgewertet (Abb. 22 A und B). Im Tumorgewebe zeigt sich kein signifikanter Verteilungsunterschied (p=0,148) zwischen HPV-negativen und HPV-assoziierten OSCC. Im Stroma HPV-assoziierter OSCC sind dagegen signifikant häufiger (p=0,010) GZMB+ Zellen zu finden als in HPV-negativen OSCC (Abb. 22 B).

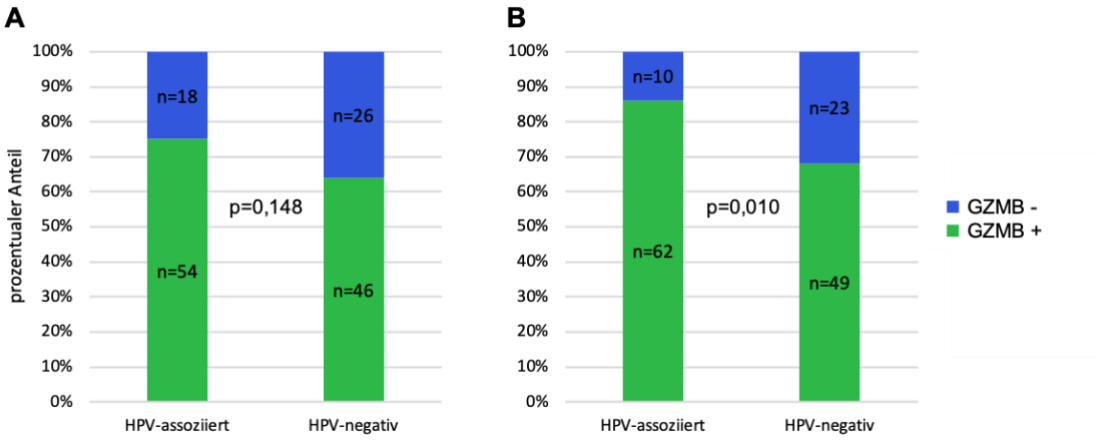


Abb. 22 Verteilung des Vorhandenseins GZMB+ Zellen nach HPV-Status stratifiziert (n=144): (A) Im Tumorgewebe HPV-assoziierter und HPV-negativer OSCC ist das Vorhandensein GZMB+ Zellen nicht signifikant unterschiedlich. (B) Im Stroma HPV-assoziierter OSCC kommen signifikant häufiger GZMB+ Zellen vor als bei negativem HPV-Status. p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden)

Der Nachweis GZMB+ Zellen im Tumorgewebe ist unabhängig vom HPV-Status nicht mit einem Überlebensvorteil assoziiert (Abb. 23 A und B). Es bestehen sowohl bei HPV-assoziierten (p=0,611) als auch bei HPV-negativen OSCC (p=0,869) keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben.

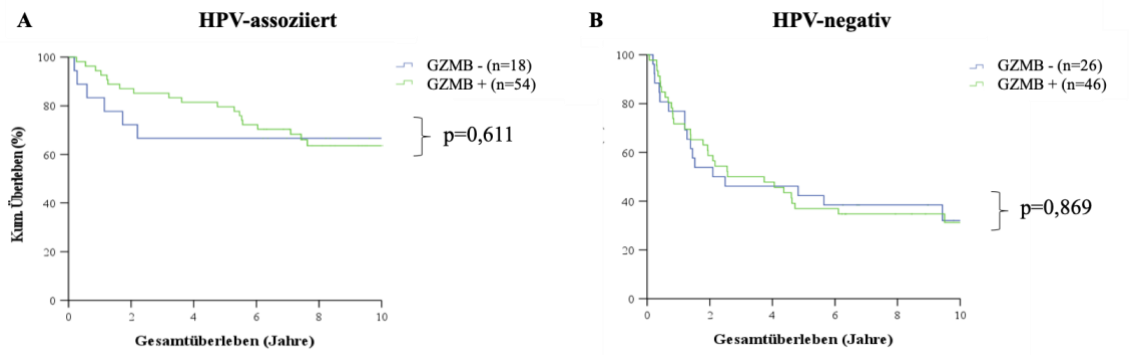


Abb. 23 Gesamtüberleben stratifiziert nach dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von GZMB+ Zellen im Tumorgewebe bei HPV-negativen sowie HPV-assoziierten OSCC: Unabhängig vom HPV-Status besteht bei keiner der Gruppen ein Überlebensunterschied (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden)

Sind GZMB+ Zellen im Stroma zu finden, besteht ein signifikanter Überlebensvorteil (p=0,006) bei Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen (Abb. 24 A und B). Dabei liegt das 5-Jahresüberleben bei 82,3% gegenüber 40% bei fehlenden GZMB+ Zellen. Bei negativem HPV-Status zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensrate.

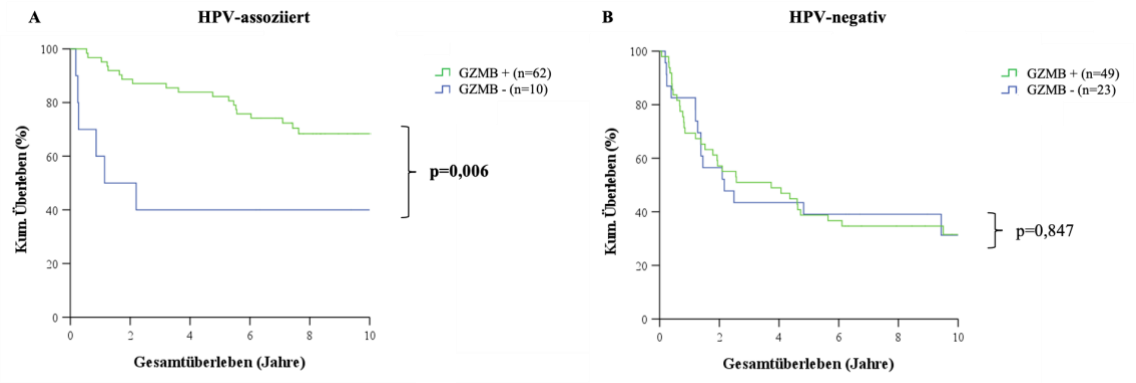


Abb. 24 Gesamtüberleben stratifiziert nach dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von GZMB+ Zellen im Stroma bei HPV-negativen sowie HPV-assoziierten OSCC: (A) Bei positivem HPV-Status ist der Nachweis GZMB+ Zellen mit einem besseren Überleben der Patienten assoziiert. (B) bei negativem HPV-Status zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden)

Betrachtet man die GZMB+ Zellen im Tumorgewebe und Stroma zusammen zeigt sich, abhängig vom HPV-Status, ein signifikanter Verteilungsunterschied (p=0,022) der Fälle (Abb. 25). Bei einem positiven HPV-Status können häufiger GZMB+ Zellen im Tumorgewebe und/oder dem Stroma gefunden werden.

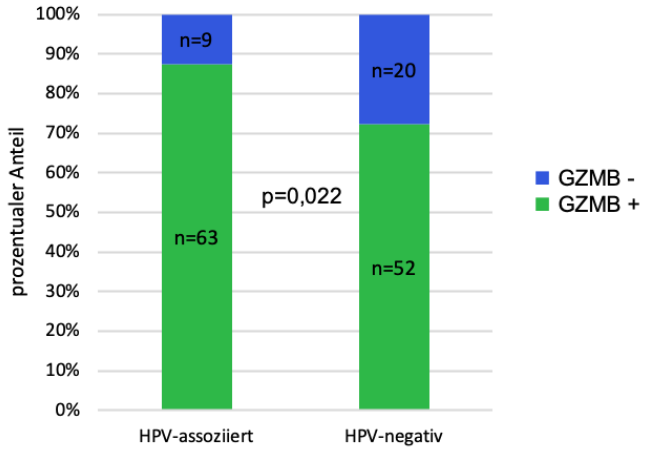


Abb. 25 Verteilung des Vorhandenseins GZMB+ Zellen im Tumor und/oder Stroma (n=144) nach dem HPV-Status aufgetrennt: HPV-assoziierte OSCC weisen in der immunhistochemischen Färbung häufiger GZMB+ Zellen auf. (p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test)). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden)

Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben zeigt sich in der Patientengruppe mit GZMB+ Zellen im Tumorgewebe und/oder Stroma ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben. In einer weiteren Kaplan-Meier-Analyse wurde das Gesamtüberleben beider Gruppen nach dem HPV-Status aufgetrennt statistisch ausgewertet (Abb. 26 A und B). In der Kohorte der HPV-assoziierten OSCC zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil für das Vorhandensein GZMB+ Zellen (p=0,008). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 81% (GZMB+ Zellen vorhanden) gegenüber 44,4% (GZMB+ Zellen nicht vorhanden). Bei einem negativen HPV-Status zeigt sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 26 B). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 40% vs. 39,8% (GZMB+ Zellen vorhanden vs. nicht vorhanden).

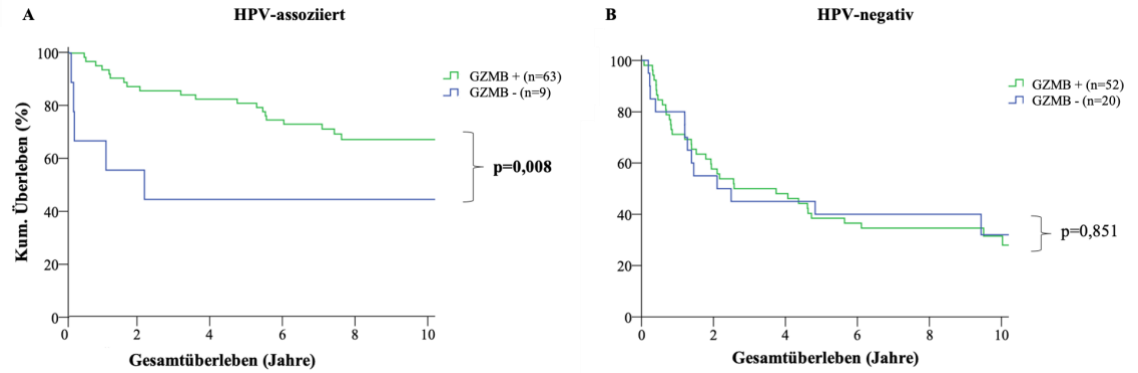


Abb. 26 Gesamtüberleben stratifiziert nach dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von GZMB+ Zellen bei HPV-negativen sowie HPV-assoziierten OSCC (n=144): (A) Bei einem HPV-assoziierten OSCC haben die Patienten ein besseres Überleben bei immunhistochemischem Nachweis von GZMB+ Zellen. (B) Patienten mit einem HPV-negativen OSCC haben keinen Überlebensvorteil bei Nachweis GZMB+ Zellen (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden)

3.3.4 Einfluss des GZMB-Status und weiterer Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben – univariate Analyse

Analog zur Analyse des b2M wurde die Häufigkeitsverteilung der zuvor definierten Risikofaktoren nach dem Vorhandensein GZMB+ Zellen stratifiziert ausgewertet (Tab. 10). Dabei besteht lediglich bei dem Risikofaktor HPV-Status ein signifikanter Verteilungsunterschied der GZMB+ Zellen: Bei HPV-assoziierten OSCC sind häufiger GZMB+ Zellen vorhanden.

Tab. 10: Statistische Auswertung der Risikofaktoren stratifiziert nach dem Vorhandensein GZMB+ Zellen

		Gesamt		$GZMB^+$ Zellen nicht vorhanden		$GZMB^+$ Zellen vorhanden		
		N	%	N	%	N	%	p-Wert
		144	100	29	20,1	115	79,9	
Risikofaktoren								
HPV	negativ	72	50,0	20	27,8	52	72,2	**0,022**
	assoziiert	72	50,0	9	12,5	63	87,5	
Alter	jung (<60 Jahre)	76	52,8	14	18,4	62	81,6	0,587
	alt (≥60 Jahre)	68	47,2	15	22,1	53	77,9	
ECOG	gesund (0-1)	96	66,7	18	18,8	78	81,3	0,516
	krank (2-4)	47	32,6	11	23,4	36	76,6	
Alkohol	nein	74	51,4	15	20,3	59	79,7	0,852
	ja (≥ 2 standard Gläser / Tag)	58	40,3	11	19,0	47	81,0	
Nikotin	nein	25	17,4	3	12,0	22	88,0	0,284
	ja (≥ 3 Zigaretten /Tag)	112	77,8	24	21,4	88	78,6	
Tumor Charakteristik								
Lokalisation	Tonsille	48	33,3	8	16,7	40	83,3	0,463
	andere als Tonsille	96	66,7	21	21,9	75	78,1	
T-stage	1-2	88	61,1	16	18,2	72	81,8	0,594
	3-4	55	38,2	12	21,8	43	78,2	
N-/M-stage	N0 & M0	29	20,1	7	24,1	22	75,9	0,517
	N>0 , M>0	112	77,8	21	18,8	91	81,3	

signifikante Ergebnisse dick markiert

Nachfolgend wurde der Einfluss des GZMB-Status auf das Patientenüberleben in die Analyse der Risikofaktoren miteingeschlossen (Tab. 11). Der Nachweis GZMB+ Zellen im Stroma bzw. bei gemeinsamer Betrachtung von Tumorgewebe und Stroma ist mit einem statistisch signifikant besseren Überleben der Patienten assoziiert.

Tab. 11: Univariate Analyse des Einflusses von GZMB+ Zellen auf das Gesamtüberleben

		medianes Überleben				Überlebensraten			
	n	OS [Jahre]	95% CI		p-Wert	2J-OS [%]	5J-OS [%]	HR (95%CI)	p-Wert
Risikofaktoren			unterer	oberer		(95%-CI)	(95%-CI)	Gesamt	
$GZMB^+$ Zellen									
nicht vorhanden (im Tumor)	44	5,641	0,000	12,985	0,472	0,591	0,523	1,000	0,473
vorhanden (im Tumor)	100	9,504	4,590	14,418		0,730	0,600	0,838	
nicht vorhanden (im Stroma)	33	2,168	0,926	3,411	**0,029**	0,515	0,394	1,000	**0,031**
vorhanden (im Stroma)	111	11,17	n.d.	n.d.		0,739	0,631	0,573	
nicht vorhanden	29	2,203	0,377	4,028	**0,044**	0,517	0,414	1,000	**0,046**
vorhanden im Tumor und/oder Stroma	115	10,030	n.d.	n.d.		0,730	0,617	0,589	

signifikante Ergebnisse dick markiert, statistische Trends unterstrichen

3.3.5 Einfluss des GZMB-Status und weiterer Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben – multivariate Analyse

Auf Grundlage der univariaten Analyse wurde mittels multivariater Analyse untersucht welche Risikofaktoren abhängig oder unabhängig voneinander einen Einfluss auf das Gesamtüberleben der OSCC-Patienten haben. In das COX-Modell wurden die allgemeinen Risikofaktoren eingeschlossen, die in der Überlebensanalyse (Tab. 8 A) einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben zeigten: HPV-Status, Alter, ECOG-Status, regelmäßiger Alkohol-Konsum, Lokalisation des Tumors und T-Status. Wie bereits zuvor beschrieben, wurde für die weiteren Analysen der GZMB-Status in Tumor und/oder Stroma zusammengefasst betrachtet. Die COX-Analyse zeigt einen unabhängigen Einfluss des Alters, des ECOG-Status, des regelmäßigen Alkohol-Konsums sowie des T-Status auf das Gesamtüberleben (Tab 12). Der positive HPV-Status, ein junges Alter, ein niedriger ECOG-Status, Alkoholabstinenz sowie ein niedriges T-Stadium zeigen einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben. Aus dem GZMB-Status sowie der Tumorlokalisation lassen sich keine prognostischen Werte auf das Gesamtüberleben ermitteln.

Tab. 12: Multivariate Analyse unter Einbeziehung der Risikofaktoren mit signifikantem Einfluss auf das Gesamtüberleben nach univariater Analyse (Tab. 8 A und 11)

	Gesamtüberleben			
	HR	95% CI		p-Wert
		unterer	oberer	
$GZMB^+$ Zellen				
nicht vorhanden vs. vorhanden	0,829	0,458	1,498	0,534
HPV-Status				
HPV-negativ vs. HPV-assoziiert	0,377	0,209	0,68	**0,001**
Alter				
jung (<60 Jahre) vs.alt (≥60 Jahre)	2,040	1,227	3,389	**0,006**
ECOG				
gesund (0-1) vs. krank (2-4)	2,322	1,321	4,081	**0,003**
Alkohol				
nein vs. ja	1,944	1,127	3,353	**0,017**
Lokalisation				
andere als Tonsille vs. Tonsille	1,218	0,646	2,299	0,542
T-Status				
1-2 vs. 3-4	2,687	1,551	4,655	**<0,001**

signifikante Ergebnisse dick markiert

3.4 Assoziation zwischen b2M und GZMB

Im folgenden Abschnitt wird eine potenzielle Assoziation zwischen den beiden zuvor jeweils einzeln analysierten Variablen „b2M-Verlust“ sowie „GZMB-Status“ untersucht. Im Gesamtkollektiv ist die Verteilung der GZMB+ gewerteten Fälle bei OSCC mit einem b2M-Verlust von >50% und von ≤50% verhältnismäßig ähnlich (Abb. 27 A). Es finden sich sowohl bei einer normalen b2M-Expression als auch bei einem b2M-Verlust häufig GZMB+ Zellen. Auch bei der Analyse der *cutoff* Werte 20% und 80% zeigt sich kein statistisch signifikanter Verteilungsunterschied (s. Anhang Abb. A1).

Anschließend wurde das Gesamtkollektiv nach dem HPV-Status aufgetrennt analysiert (Abb. 27 B und C). Es kann auch in diesen Subgruppen kein signifikanter Verteilungsunterschied der GZMB+ OSCC-Proben in Abhängigkeit vom b2M-Status gezeigt werden (HPV-neg. p=0,408 bzw. HPV-assoziiert p=0,363).

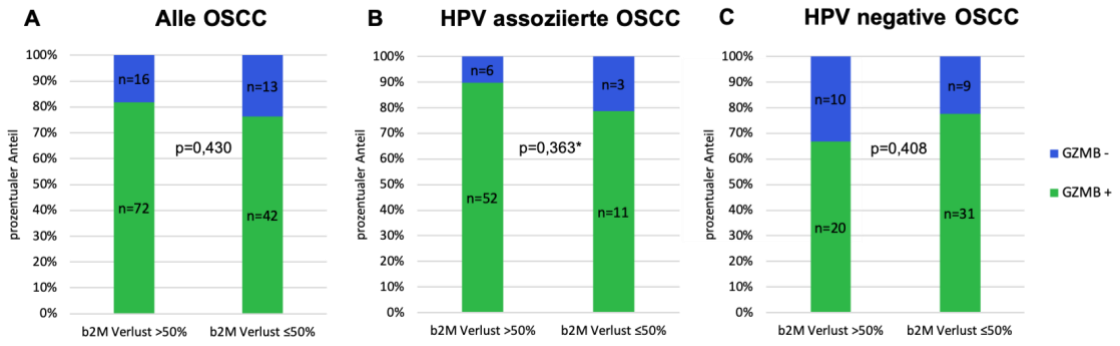


Abb. 27 Verteilung der GZMB+ Fälle nach dem b2M-Verlust bei einem *cutoff* von 50% aufgetrennt: (A-C) Es zeigt sich weder im Gesamtkollektiv (n=144) noch abhängig vom HPV-Status eine Assoziation zwischen dem b2M-Verlust und dem Vorhandensein GZMB+ Zellen. p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test oder (*) Exakter Test nach Fisher). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden)

3.4.1 Verteilung GZMB/b2M im Gesamtkollektiv

Aufgrund der Hypothese, dass bei HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen ein *„immune escape“* besteht, der durch die Runterregulierung des MHC I zytotoxische Zellen aktiviert, wurden beide Parameter in Kombination miteinander untersucht. Die Kombinations-Variable „b2M-Status x GZMB+ Zellen“ wurde wie folgt eingeteilt: „normale“ b2M-Expression (Verlust ≤50%) und GZMB+ abwesend, „normale“ b2M-Expression und GZMB+ Zellen vorhanden, nahezu vollständiger b2M-Verlust (Verlust >50%) und GZMB+ Zellen abwesend sowie nahezu vollständiger b2M-Verlust und GZMB+ Zellen vorhanden. Es zeigt sich folgende Verteilung im Gesamtkollektiv: Mit ca. 50% des Gesamtkollektivs (72 Fälle) liegt am häufigsten ein nahezu vollständiger b2M-Verlust bei gleichzeitigem Vorliegen GZMB+ Zellen vor (Abb. 27 A). Darauf folgen in abnehmender Häufigkeit eine „normale“ b2M-Expression mit GZMB+ Zellen (42 Fälle) sowie der nahezu vollständige b2M-Verlust ohne GZMB+ Zellen (16 Fälle). Eine „normale“ b2M-Expression ohne GZMB+ Zellen liegt am seltensten vor (13 Fälle) (Abb. 28).

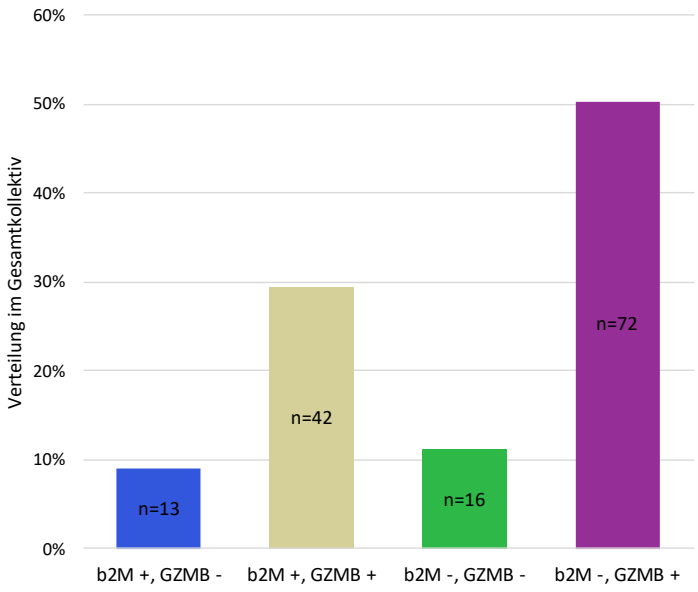
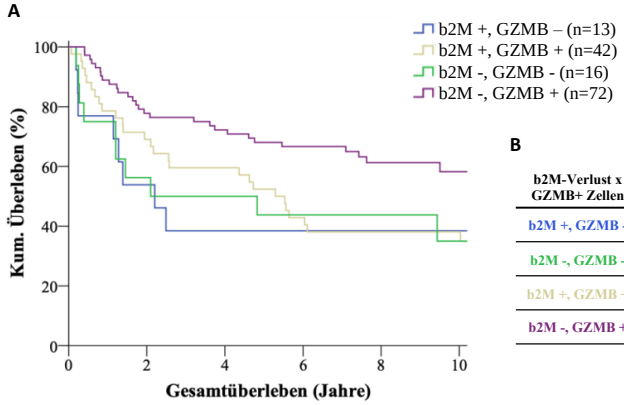


Abb. 28 Verteilung der Kombinations-Variablen aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen im Gesamtkollektiv (n=143): Bei 72 der ausgewerteten Tumorpräparate zeigt sich ein vollständiger b2M-Verlust und ein Vorliegen von GZMB+ Zellen. („b2M -“ b2M-Verlust >50%, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression, „GZMB-“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB+“ GZMB+ Zellen vorhanden)

3.4.2 Überleben aufgetrennt nach dem b2M- und GZMB-Status

Die Patienten, die nach der unter 3.4.1 definierten Kombination der beiden Variablen „b2M-Verlust“ sowie „GZMB-Status“ eingeteilt wurden, zeigen signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben (Abb. 29 A und B). Patienten deren OSCC einen b2M-Verlust sowie GZBM+ Zellen aufwiesen, haben das beste Überleben. Diese Variablenkombination zeigt einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil gegenüber allen drei anderen Kombinationen.

A



B

b2M-Verlust x GZMB+ Zellen	b2M +, GZMB -	b2M -, GZMB -	b2M +, GZMB +	b2M -, GZMB +
b2M +, GZMB -	-	0,894	0,764	**0,041**
b2M -, GZMB -	0,894	-	0,631	**0,014**
b2M +, GZMB +	0,764	0,631	-	**0,008**
b2M -, GZMB +	**0,041**	**0,014**	**0,008**	-

Abb. 29 Gesamtüberleben stratifiziert nach der Kombinations-Variablen aus dem b2M- sowie GZMB-Status der OSCC (n=143): (A) Es gibt einen Überlebensvorteil bei immunhistochemischem Nachweis von einem vollständigen b2M-Verlust in Kombination mit dem Vorhandensein GZMB+ Zellen. (B) p-Werte der Vergleiche in A nach Log-Rank-Test dargestellt. („b2M -“ b2M-Verlust >50%, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression, „GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden)

Wie oben dargestellt scheint sich in der Kaplan-Meier-Analyse die Gruppe mit vollständigem b2M-Verlust bei gleichzeitigem Vorliegen GZMB+ Zellen von den anderen Gruppen abzusetzen. Die übrigen drei Gruppen zeigen ein im Vergleich dazu reduziertes Gesamtüberleben und untereinander hingegen keine signifikanten Überlebensunterschiede. Daher wurden diese drei Gruppen, welche keinen funktionellen *„immune escape“* darstellen, für die weitere Analyse in einer Kategorie zusammengefasst. Die Überlebensanalyse der dichotomisierten Kombinationsvariable zeigt einen signifikanten Überlebensvorteil (p=0,002) der Patienten deren OSCC einen Verlust des b2M und gleichzeitigen Nachweis von GZMB+ Zellen aufweist gegenüber denjenigen, bei deren OSCC dies nicht der Fall ist (Abb. 30). Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt bei Fehlen eines der Merkmale 47,9% bzw. 68,1%, wenn ein b2M-Verlust sowie GZMB+ Zellen nachgewiesen werden konnten.

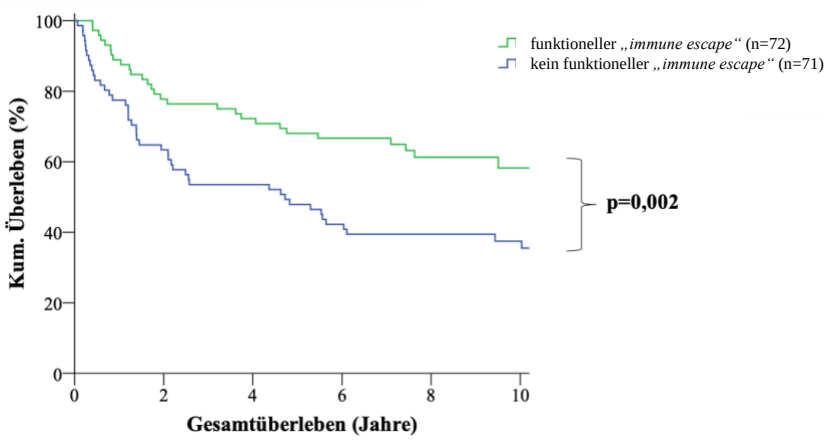


Abb. 30 Gesamtüberleben stratifiziert nach der Kombinationsvariable (dichotom) aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen (n=143): Es gibt einen Überlebensvorteil der Patienten, wenn sowohl ein vollständiger b2M-Verlust als auch GZMB+ Zellen im OSCC vorhanden sind (funktioneller *„immune escape“*) gegenüber denjenigen bei denen dies nicht der Fall ist (kein funktioneller *„immune escape“*: b2M-Verlust >50% aber keine GZMB+ Zellen vorhanden bzw. „normale“ b2M-Expression und GZMB+ Zellen vorhanden/nicht vorhanden). p: Log-Rank-Test.

3.4.3 Assoziation b2M/GZMB zum HPV-Status

In Abbildung 31 (A) ist die Verteilung der Kombinationsvariable aus dem b2M-Status und den GZMB+ Zellen dargestellt, welche nach dem HPV-Status aufgetrennt wurde. Hierbei zeigt sich ein signifikanter Verteilungsunterschied (p<0,001). In der Gruppe der HPV-assoziierten OSCC kann bei 52 von 72 Fällen ein funktioneller „*immune escape*“ mit vollständigem b2M-Verlust bei gleichzeitigem Vorliegen GZMB+ Zellen angenommen werden. Bei den HPV-negativen Tumoren zeigt sich diese Kombination jedoch nur in 20 von 71 Fällen. Mit 31 Fällen zeigt sich in dieser Gruppe am häufigsten ein unvollständiger b2M-Verlust mit dem Vorliegen GZMB+ Zellen.

Auch in der Verteilungsanalyse der dichotomisierten Variable: funktioneller vs. kein funktioneller *„immune escape“* wird ein Signifikanzniveau von p<0,001 erreicht. Bei einem positiven HPV-Status besteht häufiger ein b2M-Verlust sowie das Vorliegen von GZMB+ Zellen. In der Gruppe der HPV-negativen OSCC ist dies hingegen nicht der Fall (Abb. 31 (B)).

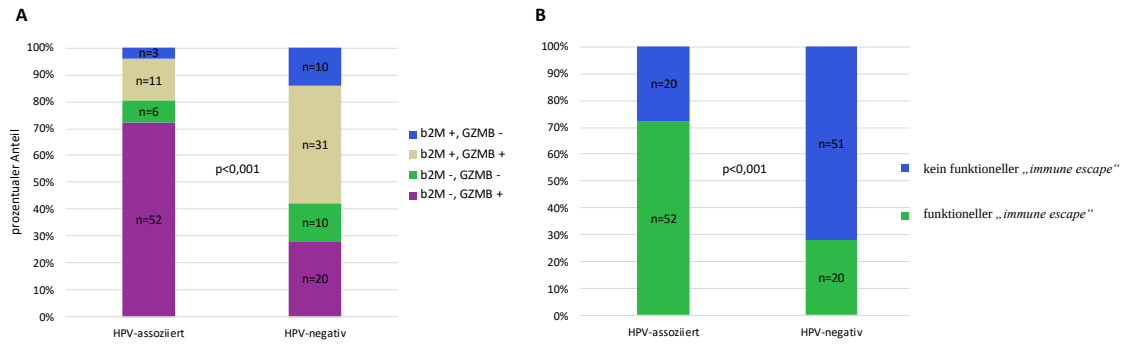


Abb. 31 Verteilung der Kombinationsvariable aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen gemäß des HPV-Status aufgeteilt (n=143): (A) HPV-assoziierte OSCC weisen häufiger einen vollständigen b2M-Verlust bei gleichzeitig vorliegenden GZMB+ Zellen auf. („b2M -“ b2M-Verlust >50%, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression, „GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden) (B) auch nach Dichotomisierung bestätigt sich dieses Ergebnis. („funktioneller *immune escape*“ b2M-Verlust >50% sowie GZMB+ Zellen im OSCC, „kein funktioneller *immune escape*“ b2M-Verlust >50% aber keine GZMB+ Zellen vorhanden bzw. „normale“ b2M-Expression und GZMB+ Zellen vorhanden/nicht vorhanden). p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test)

3.4.4 Überleben stratifiziert nach dem b2M/GZMB- und HPV-Status

Es erfolgte die Stratifizierung des Gesamtkollektivs nach dem HPV-Status und anschließend die Analyse der Überlebensraten gemäß der Kombinationsvariablen aus dem b2M/GZMB-Status (Abb. A 2 s. Anhang). Bei HPV-assoziierten OSCC scheint ein funktioneller „*immune escape*“ (b2M-Verlust in Kombination mit dem Nachweis GZMB+ Zellen) mit einem Überlebensvorteil (p=0,017) gegenüber einem b2M-Verlust ohne den Nachweis GZMB+ Zellen assoziiert zu sein. Bei HPV-negativen OSCC können keine signifikanten Überlebensunterschiede gezeigt werden.

Durch Dichotomisierung der Variable in: funktioneller *„immune escape“* vs. kein funktioneller *„immune escape“* ergeben sich jedoch in keiner der Subgruppen signifikante Überlebensunterschiede (Abb. 32 A und B).

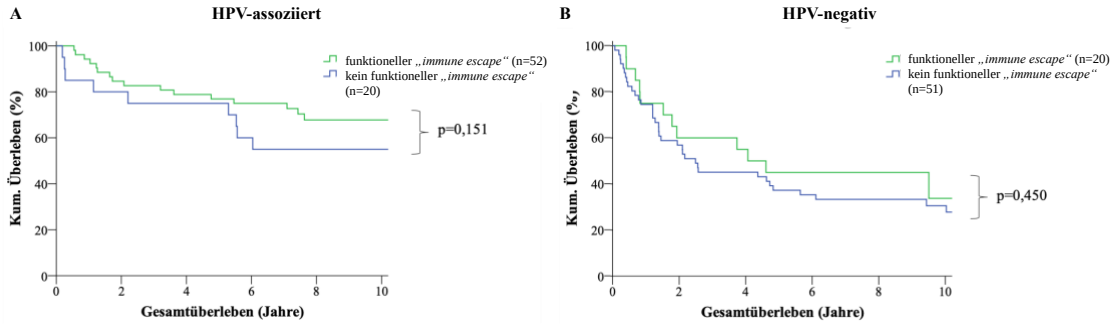


Abb. 32 Überleben nach der Kombinationsvariable (dichotom) aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen bei positivem (A) bzw. negativem (B) HPV-Status aufgeteilt: In keiner der Subgruppen besteht ein signifikanter Überlebensunterschied. (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). (funktioneller *„immune escape“*: b2M-Verlust >50% und GZMB+ Zellen vorhanden, kein funktioneller *„immune escape“*: b2M-Verlust >50% aber keine GZMB+ Zellen vorhanden bzw. „normale“ b2M-Expression und GZMB+ Zellen vorhanden/nicht vorhanden)

3.4.5 Assoziation b2M/GZMB zu weiteren Risikofaktoren

Die Häufigkeitsverteilung der zuvor definierten Risikofaktoren zeigt Verteilungsunterschiede zwischen den OSCC mit nahezu vollständigem b2M-Verlust sowie dem Nachweis GZMB+ Zellen (funktioneller *„immune escape“*) und denjenigen OSCC, bei denen mindestens eines der Merkmale fehlt (Tab. 13). OSCC bei denen kein funktioneller *„immune escape“* besteht sind häufiger HPV-negativ. Bei funktionellem *„immune escape“* besteht häufiger eine HPV-Assoziation (p<0,001) und seltener ein Alkoholkonsum von über 2 Gläsern pro Tag. Die Patienten, bei deren OSCC kein funktioneller *„immune escape“* gezeigt werden konnte, weisen annähernd gleichhäufig ein Alkoholkonsum von über oder unter 2 Gläsern pro Tag auf. Auch ein Nikotinkonsum scheint seltener zu bestehen.

Tab. 13: Statistischen Auswertung der Risikofatoren in Bezug zum b2M-Verlust sowie des Vorhandenseins GZMB+ Zellen

		Gesamt		kein funktioneller *"immune escape"*		funktioneller *"immune escape"*		
		N	%	N	%	N	%	p-Wert
		144	100	71	49,3	72	50	
Risikofaktoren								
HPV	negativ	71	49,3	51	71,8	20	28,2	**≤ 0,001**
	assoziiert	72	50,0	20	27,8	52	72,2	
Alter	jung (<60 Jahre)	76	52,8	38	50,0	38	50,0	0,929
	alt (>/=60 Jahre)	67	46,5	33	49,3	34	50,7	
ECOG	gesund (0-1)	96	66,7	51	53,1	45	46,9	0,282
	krank (2-4)	46	31,9	20	43,5	26	56,5	
Alkohol	nein	74	51,4	31	41,9	43	58,1	**0,044**
	ja (>2 standard Gläser / Tag)	57	39,6	34	59,6	23	40,4	
Nikotin	nein	25	17,4	8	32,0	17	68,0	<u>0,051</u>
	ja (>=3 Zigaretten / Tag)	112	77,8	60	53,6	52	46,4	
Tumor Charakteristik								
Lokalisation	Tonsille	48	33,3	19	39,6	29	60,4	0,087
	andere als Tonsille	95	67	52	54,7	43	45,3	
T-stage	1-2	88	61,1	42	47,7	46	52,3	0,633
	3-4	54	37,5	28	51,9	26	48,1	
N-/M-stage	N0 & M0	29	20,1	13	44,8	16	55,2	0,532
	N>0 , M>0	111	77,1	57	51,4	54	48,6	

signifikante Ergebnisse dick markiert, statistische Trends unterstrichen

Der Alkoholkonsum wurde als prognostisch schlechter Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben ausgewählt und die Überlebensraten gemäß des funktionellen *„immune escape*“ dahingehend stratifiziert dargestellt (Abb. 33 A und B). Unabhängig vom Alkoholkonsum zeigt sich ein statistischer Trend, der auf ein besseres Überleben bei Nachweis eines b2M-Verlustes sowie GZMB+ Zellen im OSCC hinweisen könnte. Das Signifikanzniveau wurde jedoch in beiden Analysen nicht erreicht.

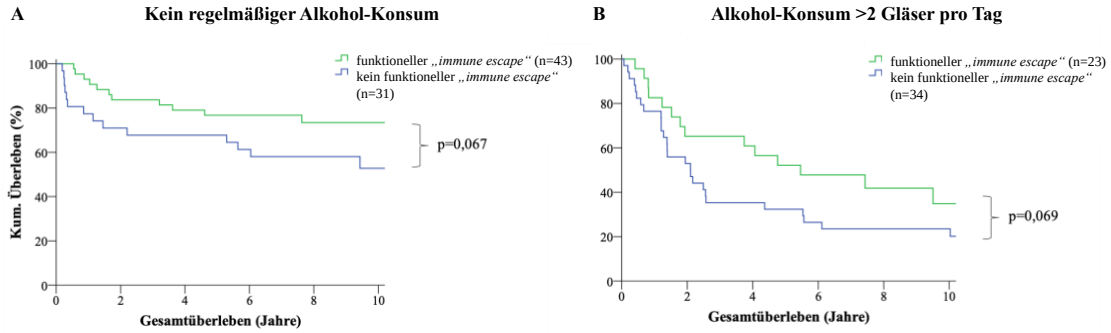


Abb. 33 Überleben von Patienten mit OSCC aufgeteilt nach der Kombinationsvariable (dichotom) aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen und nach Stratifikation anhand des Alkohol-Konsums: Unabhängig vom Alkoholkonsum besteht ein statistischer Trend hin zu einem besseren Überleben bei dem Nachweis eines b2M-Verlustes bei gleichzeitigem Vorliegen GZMB+ Zellen (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). (funktioneller *„immune escape“*: b2M-Verlust >50% und GZMB+ Zellen vorhanden, kein funktioneller *„immune escape“*: b2M-Verlust >50% aber keine GZMB+ Zellen vorhanden bzw. „normale“ b2M-Expression und GZMB+ Zellen vorhanden/nicht vorhanden)

Eine weiterführende Analyse Subgruppen aufgeteilt nach dem HPV-Status konnte aufgrund einer zu geringen Zahl an Ereignissen (<10 Ereignisse bei HPV-negativen OSCC ohne Alkoholkonsum sowie bei HPV-assoziierten OSCC mit regelmäßigem Alkoholkonsum) nicht durchgeführt werden.

4. Diskussion

4.1 Allgemein

Der Einfluss einer persistierenden HPV-Infektion auf die Entstehung des Oropharynxkarzinom sowie des Zervixkarzinoms ist bereits aus der Literatur bekannt [18, 35, 107]. In der Karzinogenese spielen die Virusproteine E5, E6 und E7 eine entscheidende Rolle. Die Virusproteine E6 und E7 inhibieren die Tumorsuppressor Proteine p53 sowie pRB. Das Virusprotein E5 ist an dem Verlust des Oberflächenmarkers MHC I beteiligt [33, 60, 81, 113]. Über den MHC I Rezeptor werden Antigene auf der Zelloberfläche präsentiert, die von CD8 positiven T-Zellen erkannt werden. Durch eine fehlende Expression des MHC I werden keine Virusproteine auf der Zellhülle präsentiert und die mit HPV infizierte Zelle wird nicht von der spezifischen Immunantwort erkannt („*immune escape*“) [28]. Natürliche Killerzellen ergänzen die spezifische Immunantwort und werden gewöhnlich durch den MHC I Rezeptor inaktiviert [24]. Eine fehlende Hemmung der NK-Zellen könnte in einer vermehrten Präsens der zytotoxischen Natürlichen Killerzellen in HPV positiven Oropharynxkarzinomen resultieren [49, 51].

Diese Arbeit hat sich mit der Fragestellung beschäftigt, ob der positive HPV-Status eines Oropharynxkarzinoms mit dem Verlust des Oberflächenmarkers MHC I und einer vermehrten Präsenz zytotoxischer Lymphozyten assoziiert ist. Weiterhin wurde ein Einfluss des GZMB-Status als Marker für zytotoxischer Lymphozyten, sowie des MHC I Verlustes auf das Überleben der Patienten untersucht.

Klassische Risikofaktoren eines Oropharynxkarzinoms sind unter Anderem Rauchen sowie der Konsum von Alkohol (>2 Standardgläser pro Tag) [3]. Auch der Einfluss dieser und anderer Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben wurde analysiert. Wie bereits in der Literatur bekannt, zeigt sich auch in diesem Kollektiv bei Patienten mit einem HPV-assoziierten OSCC ein selteneres Vorkommen der klassischen Risikofaktoren für ein Kopf-Hals-Karzinom.

4.2 Untersuchte Antigene

4.2.1 Beta-2-Mikroglobulin

Ausgehend von MHC I positiven Epithelzellen wird im Rahmen der Tumorentstehung, beispielsweise bei Brust-, Blasen- und Gebärmutterhalskrebs sowie bei Kopf-Hals-Tumoren, ein schrittweiser Übergang einer „normalen“ (physiologischen) MHC I-Expression hin zu einem vollständigen MHC I-Verlust beschrieben [28]. Um die Expression des in der Zellmembran verankerten MHC I zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Hierfür wurde das beta-2-Mikroglobolin als anzufärbendes Antigen ausgewählt, welches ein unverzichtbarer Teil des funktionellen MHC I-Rezeptors ist. Die Bindung des b2M mit der alpha-Kette ist die Voraussetzung für die funktionelle Faltung des Komplex im Endoplasmatischen Retikulum [68].

Auch in dieser Arbeit besteht ein MHC I-Verlust bei HPV-assoziierten OSCC ($p<0{,}001$ bei *„cutoff“* 50%), welcher in der Literatur als „*immune escape*“ bezeichnet wird. Durch das Fehlen des MHC I-Rezeptors werden die Virusproteine nicht mehr auf der Zellhülle präsentiert. Hierdurch wird die spezifische Immunantwort im Sinne einer T-Zellaktivierung umgangen. Ein b2M-Verlust ist in dieser Arbeit mit einem besseren Überleben der Patienten assoziiert ($p=0{,}022$). Nach Stratifizierung anhand des HPV-Status konnte jedoch kein Überlebensvorteil bei Verlust des b2M gezeigt werden. In der Arbeit von Garrido et al. (2017) wurde der Antikörper „W6/32 mAb“ verwendet um den „HLA-ABC/b2M-Komplex“ anzufärben [28]. Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, wurden bereits 1997 von Garrido et al. verschiedene Phänotypen des MHC I-Verlustes beschrieben [29]. Diese beziehen sich auf den Verlust des kompletten Komplexes bzw. einzelner Isotypen. In der Arbeit von Koene et al. (2006) wurde bei Patienten mit einem HNSCC häufiger ein Verlust der HLA-B als der HLA-A Antigenexpression detektiert [45]. Engelhardt et al. konnten ein unterschiedliches HLA-Allelfrequenzmuster bei gesunden Probanden sowie an einem Kopf-Hals-Tumor (HNSCC) erkrankten bzw. HPV-positiven und HPV-negativen Patienten nachweisen [21]. So kann in weiteren Arbeiten eine gezielte Untersuchung der Ausprägung der HLA-Allele bei OSCC erfolgen, um eine mögliche Auswirkung auf das Überleben zu untersuchen.

4.2.2 Granzym B

Perforine und Granzyme werden von zytotoxischen T-Zellen sowie Natürlichen Killerzellen ausgeschüttet, um die Apoptose einer Zielzelle einzuleiten [99]. Dabei gilt das Granzym B als das effektivste Apoptose-einleitende Granzym [94]. Zur immunchemischen Darstellung der zytotoxischen Lymphozyten wurde daher in dieser Arbeit das Granzym B Antigen gewählt. Bei OSCC mit einem positiven HPV-Status sind häufiger GZMB+ Zellen im Stroma vorhanden als bei negativem HPV-Status (p=0,01 s. Abb. 22). Dies könnte als Folge des *„immune escape“* im Sinne eines MHC I-Verlustes gewertet werden. Wie bereits erwähnt, wird die Apoptose der Zielzelle durch eine NK-Zelle induziert, wenn ein aktivierendes Signal über den stress-induzierten Liganden erfolgt, aber gleichzeitig das inhibitorische Signal durch das Fehlen des MHC I-Rezeptors ausfällt. Das Vorhandensein GZMB+ Zellen im Stroma war mit einem signifikant besseren Überleben der Patienten assoziiert (p=0,044 s. Abb. 21). Nach Stratifizierung gemäß des HPV-Status zeigt sich bei Patienten mit einem HPV-positiven OSCC ein Überlebensvorteil bei dem Vorhandensein von GZMB+ Zellen. Bei Patienten mit einem HPV-negativen OSCC besteht hingegen kein Überlebensunterschied.

Da das Granzym B jedoch wie bereits erwähnt sowohl von zytotoxischen T-Zellen als auch von NK-Zellen exprimiert wird, kann anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Immunhistochemie nicht zwischen zytotoxischen NK-Zellen und z.B. CD8 positiven T-Zellen unterschieden werden. Agarwal et al. (2016) nutzten den Oberflächenmarker CD57 zur Detektion von Natürlichen Killerzellen in OSCC-Gewebeproben. Hierbei wurde jedoch der HPV-Status der Patienten nicht untersucht. Das Vorhandensein CD57 positiver Zellen war mit einem besseren Überleben der Patienten assoziiert [1]. In der Arbeit von De Meulenaere et al. (2017) wurden verschiedene Zellmarker für B- und T-Zellen in Oropharynxkarzinomen untersucht: CD70, CD3, CD8, FoxP3. Dabei war ein besseres Überleben der Patienten mit der Anwesenheit von CD8+ zytotoxischen T-Zellen assoziiert [17]. Daher ist, wie in der Arbeit von Wagner et al., eine Doppelfärbung von GZMB und CD56 sinnvoll, um zwischen NK-Zellen und CD8 positiven T-Zellen unterscheiden zu können [98]. Wie in Abschnitt 1.5 beschrieben, unterscheiden sich zytotoxische von regulatorischen NK-Zellen anhand der Expression von CD56 und CD16 [7, 15]. In einer weiteren Arbeit wäre es sinnvoll die Präsenz und Verteilung der Natürlichen Killerzellen mit der Eigenschaft CD56dim / CD16bright bei HPV-assoziierten und HPV-negativen OSCC zu untersuchen. In der Studie von Mandal

et al. war die CD56dim NK-Zellinfiltration bei HNSCC höher als bei anderen Karzinomen (Prostata-CA, Blasen-CA, Mamma-CA, u. A.), unabhängig vom HPV-Status [56].

In der von Garrido et al. veröffentlichten Arbeit werden verschiedene Typen des MHC I Verlustes unterschieden, die verschiedene Stadien der T-Zell Immunselektion darstellen könnten [28]. In dieser Arbeit konnte bei keiner der MHC I Ausprägungen eine statistisch signifikante Assoziation zu dem Vorhandensein GZMB+ Zellen gezeigt werden. Es sollte daher an einem größeren Patientenkollektiv eine Assoziation der zytotoxischen Lymphozyten zu den unterschiedlichen MHC-Expressionen ausgewertet werden, um eine entsprechende Gruppengröße der jeweiligen Unterkategorien gewährleisten zu können.

In Kombination mit der immunhistologischen Anfärbung zur Darstellung der NK-Zellen im Gewebe kann in einer zukünftigen Arbeit auch die Durchflusszytometrie anhand frischer Gewebeproben sowie Blut zum Quantifizieren der Degranulation der NK-Zellen genutzt werden [11]. Hiermit könnte die Korrelation einer NK-Zellaktivität im Blut und im Gewebe verglichen werden.

Auch weitere Zellen der unspezifischen Immunantwort sollten in die Analyse mit einbezogen werden. So konnten z.B. Li et al. (2019) bezugnehmend auf HPV 16-positive Plattenepithelkarzinome des Mundraums eine verminderte Anzahl CD15+ Neutrophiler Granulozyten zeigen. Die Autoren führen dies auf die Herunterregulierung der Interleukin 8 Expression in HPV-assoziierten oralen Plattenepithelkarzinomen zurück [48].

4.3 Der HPV-Status und das Überleben

Es ist bekannt, dass der positive HPV-Status bei einem OSCC mit besseren Gesamtüberleben der Patienten assoziiert ist [3, 88, 109]. Dies bestätigt sich auch bei dem vorliegenden Kollektiv. Das 5-Jahresüberleben liegt mit 76,4% bei Patienten mit HPV-assoziierten OSCC deutlich höher als bei negativem HPV-Status (38,9%) (Abb. 14). Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv wurde anhand des Geschlechts, Alters und UICC-Stadiums selektiert. Nach diesen Kriterien wurden zu allen HPV-positiven Patienten der Datenbank „*matched pairs*“ gebildet. Das Patientenalter liegt in diesem selektierten Kollektiv im Median bei 58,97 Jahren. Das Patientenalter in dem vorliegenden Kollektiv liegt somit etwas unterhalb dem des Gesamtkollektivs der HNO-Tumorforschung der Klinik für HNO-Heilkunde des Universitätsklinikum Gießen, welches Daten von insgesamt 802 Patienten enthält, bei denen von 2000 bis 2017 ein OSCC diagnostiziert wurde (Median 60,8 Jahre) [96]. Überlebensanalysen zeigen in dieser Arbeit sowohl einen Überlebensvorteil bei einem Verlust des MHC I als auch bei Vorhandensein GZMB+ Zellen in OSCC. Weiterhin besteht bei OSCC mit einem positiven HPV-Status eine Assoziation zum Verlust des b2M sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen, also einem *„immune escape“*. Da das bessere Überleben der Patienten mit einem funktionellen *„immune escape“* den positiven HPV-Status abbilden könnte, wurden in weiteren Analysen die Gruppen anhand des HPV-Status aufgeteilt. Nach dieser Auftrennung konnte bei HPV-assoziierten OSCC ein signifikant besseres Gesamtüberleben in Zusammenhang mit dem Vorhandensein Granzym B+ Zellen gezeigt werden. Eine Arbeit von Wagner et al. zeigt einen Überlebensvorteil bei Vorhandensein von CD56+ Zellen. Nicht unterschieden wird allerdings zwischen regulatorischen und zytotoxischen Lymphozyten [98]. Jedoch könnte dies zeigen, dass in Abhängigkeit von einem positiven HPV-Status eine vermehrte Präsenz zytotoxischer Zellen mit einem besseren Überleben der Patienten assoziiert ist. Vergleichbare Ergebnisse sind für Kopf-Hals-Tumoren in der Literatur beschrieben [6].

In einer Auswertung von insgesamt 439 Patienten konnte im Jahr 2013 ein besseres Überleben der Patienten mit einem HPV-negativen OSCC (n=136) und einer starken MHC I/II-Expression gezeigt werden. Patienten mit einem HPV-assoziierten OSCC (n=303) zeigen hingegen bei einem MHC I-Verlust einen Überlebensvorteil [62]. In unserer Auswertung kann jedoch weder innerhalb der HPV-positiven noch der -negativen OSCC ein Überlebensvorteil durch den b2M-Status gezeigt werden. Ein Grund hierfür

könnte die Größe oder die Auswahl des Patientenkollektives sein. In dem Patientenkollektiv von Näsman et al. bestand ein signifikanter Altersunterschied zwischen den Patienten mit einem HPV-assoziierten und denen mit HPV-negativem OSCC [62]. Dieser Effekt wurde durch das Bilden der „*matched pairs*“ in dieser Arbeit aufgehoben.

Die Arbeit von Zhang et al. (2019) zeigt einen Unterschied zwischen den HPV-Typen 16 und 18 in der Assoziation zwischen der NK-Zellpräsenz und dem HPV-Status bei Zervixkarzinomen. Der HPV-Typ 16 gilt bei OSCC als der am häufigsten vorkommende HPV-Typ, wie auch die Untersuchung von Wagner et al. (2020) zeigte [39, 96, 114]. Eine Differenzierung zwischen den einzelnen HPV-Typen könnte jedoch in zukünftige Auswertungen mit einbezogen werden.

4.4 Weitere Risikofaktoren

Regelmäßiger Alkohol- und Nikotinkonsum stellen die klassischen Risikofaktoren für die Entstehung eines OSCC dar [3, 76]. Beide Substanzen sind bekannt dafür, dass sie immunsuppressive Eigenschaften haben. Bei chronischem Konsum kann Alkohol die Fähigkeit der dendritischen Zellen beeinträchtigen Antigene zu präsentieren und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen erhöhen [55]. Daher kann durch einen erhöhten Alkoholkonsum die Präsentation von HPV-Antigenen durch MHC-I beeinträchtigt werden. Nikotin kann die Zytokin Produktion und die Antikörperantwort negativ beeinflussen. Daher könnte ein vermehrter Nikotinkonsum die Zahl der GZMB-positiven Zellen im Gewebe verringern und die Effizienz der zytotoxischen Antwort gegen HPV-infizierte Zellen beeinträchtigen [13]. Es hat sich gezeigt, dass bei HPV-assoziierten OSCC jedoch signifikant seltener ein regelmäßiger Alkohol- und Nikotinkonsum der Patienten besteht [3, 23]. Auch in dem Patientenkollektiv dieser Arbeit spiegelt sich diese Verteilung wider. Dabei ist allerdings zu beachten, dass das Antwortverhalten der Patienten bei der Anamnese im Sinne einer „sozialen Erwünschtheit“ beeinflusst sein könnte. Daher sind valide Daten schwer zu erheben [20]. Lange et al. beschrieben 2016, dass zwischen 2008 und 2011in Deutschland Männer signifikant häufiger „riskante Mengen“ an Alkohol konsumieren als Frauen. Hierbei wurde die „riskante Menge“ für Männer als >20g bzw. für Frauen mit >10g Reinalkohol

pro Tag festgelegt [77]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Einheit „Standardglas“ verwendet, das durch einen Ethanolgehalt von 15,6ml (ca. 12g) definiert ist [34]. Ein Alkoholkonsum von weniger als zwei Standardgläsern pro Tag zeigt in dem hier vorliegenden Kollektiv einen prognostisch günstigen Einfluss auf das Überleben. Owosho et al. (2018) untersuchten retrospektiv die Daten von insgesamt 431 Patienten, bei denen zwischen 1999 und 2013 ein HPV-assoziiertes OSCC diagnostiziert wurde. Es zeigt sich, dass signifikant häufiger Männer als Frauen an einem HPV-assoziierten OSCC erkrankten [66]. In der Arbeit von Näsman et al. (2013) waren jedoch unabhängig vom HPV-Status, insgesamt häufiger Männer als Frauen von einem OSCC betroffen [62]. Dies könnte auf der Prävalenz der oben genannten Risikofaktoren beruhen. Laut einer Auswertung des Robert Koch Institutes nimmt die Prävalenz für einen riskanten Alkoholkonsum in der deutschen männlichen Bevölkerung mit zunehmendem Alter zu und erreicht das Maximum bei einem Alter zwischen 60 und 69 Jahren. Bei Frauen ist die Prävalenz für einen riskanten Alkoholkonsum mit einem Nikotinkonsum assoziiert. In der zeitlichen Entwicklung zeigte sich jedoch sowohl bei Männern als auch bei Frauen zwischen 1990 und 2016 insgesamt ein Rückgang des Alkoholkonsums [77]. Bezüglich einer Assoziation zwischen dem Nikotinkonsum und dem positiven HPV-Status in der Karzinogenese von OSCC besteht Uneinigkeit in der Literatur [108]. Wie bereits erwähnt, ist bei HPV-negativen OSCC ein schlechteres Gesamtüberleben bekannt. Eine unterschiedliche Immunantwort, abhängig von der Art der Tumorentstehung, scheint hierbei ein entscheidender Faktor zu sein. Ein erhöhter Nikotinkonsum korreliert in der Arbeit von Mandal et al. mit einer höheren Rate an Genmutationen sowie einer geringeren Immunzellinfiltration bei HNSCC [56]. Bezüglich der Immunzellinfiltrationsrate zeigten Partlová et al., dass HPV-assoziierte HNSCC eine höhere Infiltrationsrate von CD8+ Lymphozyten, Dendritischen Zellen und proinflammatorischen Chemokinen aufweisen [69]. 1990 zeigten Nair et al. im Zellmodell, dass eine Kombination aus Alkohol und Nikotin eine Reduktion der NK-Zellaktivität verursacht [61]. In dem hier vorliegenden Kollektiv zeigt sich bei HPV-assoziierten OSCC ein vermehrtes Vorkommen von GZMB+ Zellen (Tumor und/oder Stroma), unabhängig vom Alkohol- und Nikotinkonsum. Patienten, mit einem Alkoholkonsum von weniger als zwei Standardgläsern pro Tag, zeigen jedoch signifikant häufiger einen b2M-Verlust ($p=0,022$) sowie einen funktionellen „immune escape“ ($p=0,044$).

Ein junges Alter, ein niedriger ECOG-Status sowie ein niedriges T-Stadium waren in dem vorliegenden Kollektiv mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert. Aufgrund der Selektion des Patientenkollektivs kann in dieser Arbeit keine Aussage über die Verteilung der Merkmale Alter und TNM-Stadium der Patienten mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OSCC getroffen werden. In der Literatur wird beschrieben, dass Patienten mit HPV-assoziierten OSCC häufiger kleine Tumorgrößen (T1-T2) jedoch ebenfalls häufiger eine Lymphknoten- oder Fernmetastasierung aufweisen [3, 23, 105]. Neben der Fernmetastasierungsrate scheint sich auch die Fernmetastasen-Lokalisation bei HPV-assoziierten und HPV-negativen Kopf-Hals-Tumoren zu unterscheiden. So zeigen sich in einer retrospektiven Untersuchung von Sacks et al. bei Patienten mit einem HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumor häufiger Lungenmetastasen als bei negativem oder unklarem HPV-Status [78]. Es könnte in weiteren Studien eine immunhistologische Untersuchung der MHC I-Expression, sowie des Vorhandenseins aktiver zytotoxischer Zellen in Abhängigkeit des Metastasierungsstatus von OSCC untersucht werden.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich bei Patienten mit einem HPV-assoziierten OSCC ein Überlebensvorteil bei einem Vorkommen von GZMB+ Zellen. Auch die Arbeit von Wagner et al. (2016) zeigt eine Assoziation zwischen einem vermehrten Vorkommen zytotoxischer NK-Zellen mit einem verbesserten Überleben bei HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen [98]. Die vermehrte Infiltration von CD8+ T Zellen ist in der Arbeit von Oguejiofor et al. (2015) ebenfalls mit einem besseren „*Outcome*“ assoziiert [64]. So könnte der Einfluss der körpereigenen Immunantwort auf das Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen in Zukunft Möglichkeiten zur medikamentösen Antikörpertherapie bieten und sollte daher weiterverfolgt werden. Auch der Einsatz von Chemokinen zur Immunmodulation sollte in weiteren Studien untersucht werden. Das Chemokin CXCL14 steigert die Infiltration von NK-Zellen und CD8+ T Zellen in die Lymphknoten des Tumorabflussgebietes. Die Arbeit von Westrich et al. (2019) zeigt im Mausmodell einen günstigen Einfluss von CXCL14 auf die Tumorsuppression. Im Mausmodell konnte ein Anstieg der CD8+ T-Zellen im Tumorgewebe nach Injektion von CXCL 14 bestätigt werden. Weiterhin zeigten die Mäuse, welche die CXCL 14 Injektion erhielten, ein verlangsamtes Tumorwachstum. Allerdings schien hierfür die Präsenz des MHC I Voraussetzung zu sein [102].

Neben der prophylaktischen Impfung gegen HPV ist auch ein therapeutisches Eingreifen in die Karzinogenese HPV-assoziierter Tumoren durch einen synthetischen Impfstoff gegen die Onkoproteine E6 und E7 Gegenstand aktueller Forschung. Hierbei werden bereits in verschiedenen Versuchsreihen Protein- sowie Vektorbasierte Impfstoffe erprobt [44, 93].

5. Zusammenfassung

Kopf-Hals-Tumoren sind weltweit die 6-häufigste Tumorerkrankung. Hiervon bildet das Oropharynxkarzinom den größten Anteil. Als Hauptrisikofaktoren gelten chronischer Tabak- sowie Alkoholkonsum, aber auch eine persistierende Infektion mit einem „*high risk*“ Humanen Papilloma Virus. Ein HPV-assoziiertes Oropharynxkarzinom ist bekanntlich mit einem besseren Patientenüberleben assoziiert, welches sich auch in dieser Arbeit bestätigen ließ. Ein Teil der viralen Onkogenese ist der Verlust des Oberflächenrezeptors MHC I. Dies führt zu einer fehlenden Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche – einem Virus-induzierten „*immune escape*“ der Tumorzellen. Durch das Fehlen dieses Rezeptors ist jedoch wiederum eine Aktivierung zytotoxischer Natürlicher Killerzellen möglich, was in dieser Arbeit näher untersucht wurde. Wir konnten zeigen, dass eine Assoziation zwischen positivem HPV-Status, einem b2M-Verlust, sowie der Anwesenheit GZMB+ Zellen besteht. Ein Verlust des b2M sowie das Vorhandensein Granzym B+ Zellen war mit einem besseren Überleben der Patienten assoziiert. In Subgruppen stratifiziert nach dem HPV-Status, zeigte der b2M-Verlust jedoch keinen Einfluss auf das Überleben. Dagegen war in der Gruppe der HPV-assoziierten Oropharynxkarzinome die Präsenz GZMB+ Zellen mit einem signifikant besseren Überleben assoziiert. In einer multivariaten Analyse der Risikofaktoren wurden der HPV-Status, das Alter, der ECOG-Status, der Alkoholkonsum sowie das T-Stadium als unabhängige Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben von Patienten mit OSCC bestätigt. Aus den Faktoren „b2M-Verlust“ sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen wurde eine Kombinations-Variable gebildet, die einen funktionellen „*immune escape*“ abbildet. Die Überlebensanalyse zeigte einen signifikanten Überlebensvorteil bei Vorliegen eines funktionellen „*immune escape*“. Die Verteilung im Gesamtkollektiv zeigte eine Assoziation zwischen dem funktionellen „immune escape“ und dem HPV-Status, die sich jedoch auch in der Häufigkeitsverteilung der mit HPV-assoziierten Risikofaktoren Nikotin- und Alkoholkonsum widerspiegelt und keinen Überlebensvorteil in den nach dem HPV-Status aufgetrennten Subgruppen mit sich brachte. Zu diskutieren bleibt ob in weiteren Arbeiten eine nähere Bestimmung der aktiven zytotoxischen Zellen gemäß der Oberflächenmarker CD56 und CD16 erfolgen sollte. Weiterhin wären auch der Einfluss unterschiedlicher Zusammensetzungen des MHC I Komplexes zu untersuchen.

6. Abstract

Head and neck tumors are the 6th most common tumor disease worldwide. Of these, oropharyngeal carcinoma accounts for the largest proportion. The main risk factors are chronic tobacco and alcohol consumption, but also persistent infection with a "high risk" human papilloma virus. HPV-associated oropharyngeal carcinoma is known to be associated with better patient survival rate, which was also confirmed in this study. Part of viral oncogenesis is loss of the surface receptor MHC I. This leads to a lack of antigen presentation on the cell surface - a virus-induced "immune escape" of the tumor cells. However, the absence of this receptor allows activation of cytotoxic natural killer cells, which was further investigated in this study. We demonstrated that there was an association between positive HPV status, a loss of b2M, and the presence of GZMB+ cells. A loss of b2M as well as the presence of granzyme B+ cells was associated with better patient survival rate. However, in subgroups stratified by HPV status, b2M loss showed no effect on survival rate. In contrast, in the HPV-associated oropharyngeal cancer group, the presence of GZMB+ cells was associated with significantly better survival rate. In a multivariate analysis of risk factors HPV status, age, ECOG status, alcohol consumption, and T stage were confirmed as independent factors influencing overall survival of patients with OSCC. A combination variable was formed from the factors "b2M loss" as well as the presence of GZMB+ cells, which depicted a functional "immune escape". The analysis of survival rate showed a significant advantage in the presence of a functional immune escape. The distribution in the overall population showed an association between functional immune escape and HPV status, but this was also reflected in the frequency distribution of the risk factors associated with HPV, nicotine and alcohol consumption and did not confer a survival advantage in the subgroups separated by HPV status. It remains to be discussed whether a more detailed determination of the active cytotoxic cells according to the surface markers CD56 and CD16 should be performed in further work. Furthermore, the influence of different compositions of the MHC I complex should be investigated.

7. Abkürzungsverzeichnis

2Y-OS	„*2 years overall survival*“
5Y-OS	„*5 years overall survival*“
5-JÜR	5 Jahres-Überlebensrate
95% I	95% Konfidenzintervall
Abb.	Abbildung
b2M	Beta-2-Mikroglobuline
BSA	Bovine Serumalbumine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
COPD	„c*hronic obstructive pulmonary disease*“
DAB-Substrat	3,3’-diaminobenzidine Substrat
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	„d*eoxyribonucleic acid*“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und weitere
GZMB	Granzym B
GZMB+ Zellen	Granzym B positive Zellen
Gy	Gray
h	Stunde
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HNO	Hals-, Nasen-, Ohren-
Hpf	„*high power field*“
HPV	Humanes Papilloma Virus
HR	Hazard Ratio
IHC	Immunhistochemie
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton

KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
kum.	kumulativ
l	Liter
lat.	„*lateral*“
LK	Lymphknoten
m.	„*musculus*“
MHC I	„*Major Histocompatibility Complex Class 1*“
min	Minuten
ml	Milliliter
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
n. s.	nicht signifikant
OT	Objektträger
OS	„o*verall survival*“ (Gesamtüberleben)
OSCC	„*Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma*“
p	Wahrscheinlichkeit
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate-gepufferte Kochsalzlösung (“*phoshate buffered saline”*)
Proc.	„*processus*“
Q_{25}	erstes Quartil
Q_{75}	drittes Quartil
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sek	Sekunden
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAP	„*transporter associated with antigen processing*“
TBS	„*Tris-Buffered Saline*“
TBST	„*Tris-Buffered Saline with Tween 20*“
TNM-Klassifikation	„*Tumor-Nodes-Metastasis Classification*“

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polysorbate 20
u. A.	unter Anderem
u. U.	unter Umständen
UICC	„*Union Internationale Contre Le Cancer*“
VE H_2O	voll entsalztes Wasser
vergl.	Vergleich
vs.	versus
WHO	„*World Health Organization*“
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius

In der vorliegenden Arbeit wurden aus Gründen der Lesbarkeit die Bezeichnungen „Patient“ sowie „Arzt“ neutral für Patientinnen und Patienten sowie Ärztinnen und Ärzte verwendet.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Einfluss des Virusprotein E6 auf den Zellzyklus: Verlust der Apoptoseeinleitung durch Ubiquitinierung und Abbau des p53 sowie fehlende Hemmung des E2F/DP-Komplex und dadurch Erleichterung des Eintritts von der G1 in die S-Phase unter Umgehung der Kontrollpunkte. 11

Abb. 2 Einfluss des Virusprotein E7 auf den Zellzyklus: Durch Degradation des Retinoblastomaprotein RB1 wird der E2F1/Dp-Komplex freigesetzt, welcher den Eintritt von der G1 in die S-Phase erleichtert. 12

Abb. 3 T-Zell Aktivierung durch den MHC I Rezeptor: CD8 bindet an den MHC I-Rezeptor und löst eine Kaskade von Signaltransduktoren aus, welche die Caspasen 8 und 3 aktivieren und so die Apoptose einleiten. 14

Abb. 4 Vereinfachtes Schema des MHC I Rezeptors: Das beta-2-Mikroglobulin verbindet die alpha-1 und -2 Ketten an ihrer Basis, welche die Peptid-Bindungsstelle bilden. 15

Abb. 5 „Pathway" der Antigenpräsentation über den MHC I Rezeptor: Die Peptide des im Proteasom zerlegten viralen Antigens werden in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums transportiert und dort vom MHC I-Rezeptor gebunden, der wiederum den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche transportiert wird. 16

Abb. 6 Vereinfachtes Schema der Zielzell-Erkennung durch den inhibitorischen und aktivierenden Rezeptor der NK-Zelle: Fehlt der MHC I-Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle, fällt das inhibitorische Signal weg und es kann über die Bindung des Stress-induzierten Liganden an den aktivierenden Rezeptor der Natürlichen Killerzelle die Lyse der Zielzelle eingeleitet werden. 19

Abb. 7 Präparat P002, 40x Objektiv: Die randständige Färbung der Tumorzellen stellt den nahezu vollständigen Erhalt des b2M auf der Zelloberfläche dar. 30

Abb. 8 Präparat P023, 40x Objektiv: Über die Hälfte der Tumorzellen weist keine randständige Färbung der Zellmembran, sondern lediglich die Kernfärbung auf. ... 31

Abb. 9 Zählschema der immunhistochemisch angefärbten zytotoxischen Zellen: Die Auszählung der Zellen erfolgte bei Verwendung des 40x-Objektivs in einem Rasterschema von jeweils drei mal drei Sichtfeldern im Stroma und im Tumorgewebe. 31

Abb. 10 Präparat P044, 100x Objektiv: Die Abbildungen (A) und (B) zeigen die immunhistochemische rot angefärbten typischen Granula einer Granzym B+ Zelle im Tumorgewebe. 32

Abb. 11 Präparat P096, 100x Objektiv: immunhistochemische Anfärbung mehrerer Zellen im Stroma, welche Granzym B haltige Granula enthalten. 32

Abb. 12 Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs (n=144): Das 5-Jahresüberleben liegt bei 57,6% (zensierte Fälle nicht dargestellt). 34

Abb. 13 Gesamtüberleben stratifiziert nach dem HPV-Status (n=144): Die Überlebensrate ist bei Vorliegen eines HPV-assoziierten Oropharynxkarzinoms höher (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). 35

Abb. 14 Verteilung des b2M-Verlustes auf der Tumorfläche der auswertbaren Fälle (n=143): In 51 der ausgewerteten immunhistochemischen Färbungen liegt ein b2M-Verlust von 81-100% der Tumorfläche vor. 36

Abb. 15 Gesamtüberleben der auswertbaren Fälle, stratifiziert nach dem b2M-Verlust (n=143): (A) Die Überlebensrate der Patienten ist bei einem immunhistochemischen Nachweis eines nahezu vollständigen b2M-Verlustes (>80%) höher als bei einer „normalen“ b2M-Expression b2M-Verlust ≤ 20%). (B) p-Werte der Vergleiche in A (Log-Rank-Test). 37

Abb. 16 Verteilung des b2M-Verlustes der auswertbaren Fälle, nach dem HPV-Status aufgetrennt (n=143): In der immunhistochemischen Färbung zeigen HPV-assoziierte Oropharynxkarzinome häufiger einen b2M-Verlust. p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test) 38

Abb. 17 Häufigkeitsverteilung des b2M-Verlustes der auswertbaren Fälle bei HPV-assoziierten und HPV-negativen OSCC, aufgetrennt nach verschiedenen cutoff-Werten (n=143): (A) Bei einem cutoff-Wert von 20% weisen HPV-assoziierte Oropharynxkarzinome häufiger einen immunhistochemischen Verlust des b2M als HPV-negative OSCC auf. Auch bei einem cutoff-Wert von 50% (B) und einem cutoff-Wert von 80% (C) zeigen HPV-assoziierte OSCC häufiger einen Verlust des b2M. p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test). („b2M -“ b2M-Verlust, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression) 39

Abb. 18 Gesamtüberleben der auswertbaren Fälle, stratifiziert nach dem b2M-Verlust bei dem cutoff 50% (n=143): Es besteht eine höhere Überlebensrate bei einem immunhistochemischen Nachweis eines b2M-Verlustes im Primärtumor von

mehr als 50% der ausgewerteten Tumorfläche (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („b2M -“ b2M-Verlust >50%, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression) 40

Abb. 19 Gesamtüberleben der auswertbaren Fälle, stratifiziert nach dem b2M-Verlust in HPV-negativen bzw. HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen (n=143): Bei HPV-assoziierten (A) und HPV-negativen OSCC (B) zeigt sich das Patientenüberleben unabhängig von der b2M-Expression (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („b2M -“ b2M-Verlust >50%, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression).....40

Abb. 20 Verteilung GZMB+ Fälle im Gesamtkollektiv (n=144): Sowohl im Stroma (A) als auch im Tumorgewebe (B) wurden in deutlich mehr Gewebeproben mit GZMB+ Zellen als ohne detektiert. („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden).....45

Abb. 21 Gesamtüberleben der Patienten mit OSCC (n=144) stratifiziert nach dem Vorhandensein GZMB+ Zellen: Bei Nachweis GZMB+ Zellen besteht eine signifikant höhere Überlebensrate (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden) 46

Abb. 22 Verteilung des Vorhandenseins GZMB+ Zellen nach HPV-Status stratifiziert (n=144): (A) Im Tumorgewebe HPV-assoziierter und HPV-negativer OSCC ist das Vorhandensein GZMB+ Zellen nicht signifikant unterschiedlich. (B) Im Stroma HPV-assoziierter OSCC kommen signifikant häufiger GZMB+ Zellen vor als bei negativem HPV-Status. p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden) 47

Abb. 23 Gesamtüberleben stratifiziert nach dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von GZMB+ Zellen im Tumorgewebe bei HPV-negativen sowie HPV-assoziierten OSCC: Unabhängig vom HPV-Status besteht bei keiner der Gruppen ein Überlebensunterschied (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden).....47

Abb. 24 Gesamtüberleben stratifiziert nach dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von GZMB+ Zellen im Stroma bei HPV-negativen sowie HPV-assoziierten OSCC: (A) Bei positivem HPV-Status ist der Nachweis GZMB+ Zellen mit einem besseren Überleben der Patienten assoziiert. (B) bei negativem HPV-Status zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden) 48

Abb. 25 Verteilung des Vorhandenseins GZMB+ Zellen im Tumor und/oder Stroma (n=144) nach dem HPV-Status aufgetrennt: HPV-assoziierte OSCC weisen in der immunhistochemischen Färbung häufiger GZMB+ Zellen auf. (p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test)). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden) 48

Abb. 26 Gesamtüberleben stratifiziert nach dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von GZMB+ Zellen bei HPV-negativen sowie HPV-assoziierten OSCC (n=144): (A) Bei einem HPV-assoziierten OSCC haben die Patienten ein besseres Überleben bei immunhistochemischem Nachweis von GZMB+ Zellen. (B) Patienten mit einem HPV-negativen OSCC haben keinen Überlebensvorteil bei Nachweis GZMB+ Zellen (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden) 49

Abb. 27 Verteilung der GZMB+ Fälle nach dem b2M-Verlust bei einem cutoff von 50% aufgetrennt: (A-C) Es zeigt sich weder im Gesamtkollektiv (n=144) noch abhängig vom HPV-Status eine Assoziation zwischen dem b2M-Verlust und dem Vorhandensein GZMB+ Zellen. p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test oder (*) Exakter Test nach Fisher). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden) 52

Abb. 28 Verteilung der Kombinations-Variablen aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen im Gesamtkollektiv (n=143): Bei 72 der ausgewerteten Tumorpräparate zeigt sich ein vollständiger b2M-Verlust und ein Vorliegen von GZMB+ Zellen. („b2M -“ b2M-Verlust >50%, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression, „GZMB-“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB+“ GZMB+ Zellen vorhanden) 53

Abb. 29 Gesamtüberleben stratifiziert nach der Kombinations-Variablen aus dem b2M- sowie GZMB-Status der OSCC (n=143): (A) Es gibt einen Überlebensvorteil bei immunhistochemischem Nachweis von einem vollständigen b2M-Verlust in Kombination mit dem Vorhandensein GZMB+ Zellen. (B) p-Werte der Vergleiche in A nach Log-Rank-Test dargestellt. („b2M -“ b2M-Verlust >50%, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression, „GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden) 54

Abb. 30 Gesamtüberleben stratifiziert nach der Kombinationsvariable (dichotom) aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen (n=143): Es gibt einen Überlebensvorteil der Patienten, wenn sowohl ein vollständiger b2M-Verlust

als auch GZMB+ Zellen im OSCC vorhanden sind (funktioneller *„immune escape“*) gegenüber denjenigen bei denen dies nicht der Fall ist (kein funktioneller *„immune escape“*: b2M-Verlust >50% aber keine GZMB+ Zellen vorhanden bzw. „normale“ b2M-Expression und GZMB+ Zellen vorhanden/nicht vorhanden). p: Log-Rank-Test. 55

Abb. 31 Verteilung der Kombinationsvariable aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen gemäß des HPV-Status aufgeteilt (n=143): (A) HPV-assoziierte OSCC weisen häufiger einen vollständigen b2M-Verlust bei gleichzeitig vorliegenden GZMB+ Zellen auf. („b2M -“ b2M-Verlust >50%, „b2M +“ „normale“ b2M-Expression, „GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden) (B) auch nach Dichotomisierung bestätigt sich dieses Ergebnis. („funktioneller immune escape“ b2M-Verlust >50% sowie GZMB+ Zellen im OSCC, „kein funktioneller immune escape“ b2M-Verlust >50% aber keine GZMB+ Zellen vorhanden bzw. „normale“ b2M-Expression und GZMB+ Zellen vorhanden/nicht vorhanden). p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test).....56

Abb. 32 Überleben nach der Kombinationsvariable (dichotom) aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen bei positivem (A) bzw. negativem (B) HPV-Status aufgeteilt: In keiner der Subgruppen besteht ein signifikanter Überlebensunterschied. (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). (funktioneller *„immune escape“*: b2M-Verlust >50% und GZMB+ Zellen vorhanden, kein funktioneller *„immune escape“*: b2M-Verlust >50% aber keine GZMB+ Zellen vorhanden bzw. „normale“ b2M-Expression und GZMB+ Zellen vorhanden/nicht vorhanden).....57

Abb. 33 Überleben von Patienten mit OSCC aufgeteilt nach der Kombinationsvariable (dichotom) aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen und nach Stratifikation anhand des Alkohol-Konsums: Unabhängig vom Alkoholkonsum besteht ein statistischer Trend hin zu einem besseren Überleben bei dem Nachweis eines b2M-Verlustes bei gleichzeitigem Vorliegen GZMB+ Zellen (p: p-Wert (Log-Rank-Test)). (funktioneller „immune escape“: b2M-Verlust >50% und GZMB+ Zellen vorhanden, kein funktioneller „immune escape“: b2M-Verlust >50% aber keine GZMB+ Zellen vorhanden bzw. „normale“ b2M-Expression und GZMB+ Zellen vorhanden/nicht vorhanden) 59

Abb. A 1 Verteilung der GZMB+ Fälle nach dem b2M-Verlust aufgetrennt: (A-C) bei keinem der verwendeten cutoff-Werte zeigt sich eine Assoziation zwischen dem b2M-Verlust und dem Vorhandensein GZMB+ Zellen. p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test oder (*) Exakter Test nach Fisher). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden).....91

Abb. A 2 Gesamtüberleben stratifiziert nach der Kombinationsvariable aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen in Abhängigkeit vom HPV-Status: (A) Patienten mit einem HPV-assoziierten OSCC haben bei Vorliegen eines b2M-Verlustes einen Überlebensvorteil nur in Kombination mit dem Nachweis GZMB+ Zellen (p-Werte nach Log-Rank-Test in (C) dargestellt). (B) bei HPV-negativen OSCC ergibt sich aus keiner der Kombinationen ein Überlebensvorteil, p-Werte nach Log-Rank-Test in (D) dargestellt). („b2M-Verlust -“ b2M-Verlust ≤50%, „b2M-Verlust +“ b2M-Verlust >50%, „GZMB+ Zellen -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB+ Zellen +“ GZMB+ Zellen vorhanden) 91

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Deskriptive Analyse des Patientenkollektivs 22
Tab. 2: Verwendete Geräte 22
Tab. 3: Verwendete Chemikalien 23
Tab. 4: Verwendete Puffer 24
Tab. 5: Verwendete KIT-Systeme 24
Tab. 6: Verwendete Primärantikörper 25
Tab. 7: Statistische Auswertung der Risikofaktoren stratifiziert nach dem b2M-Verlust 42
Tab. 8: Univariate Analyse des Einflusses von Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben 43
Tab. 9 Multivariate Analyse unter Einbeziehung aller Risikofaktoren mit signifikantem Einfluss auf das Gesamtüberleben nach univ. Analyse (Tab. 8 A und B) 44
Tab. 10: Statistische Auswertung der Risikofaktoren stratifiziert nach dem Vorhandensein GZMB+ Zellen 50
Tab. 11: Univariate Analyse des Einflusses von GZMB+ Zellen auf das Gesamtüberleben 50
Tab. 12: Multivariate Analyse unter Einbeziehung der Risikofaktoren mit signifikantem Einfluss auf das Gesamtüberleben nach univariater Analyse (Tab. 8 A und 11) 51
Tab. 13: Statistischen Auswertung der Risikofatoren in Bezug zum b2M-Verlust sowie des Vorhandenseins GZMB+ Zellen 58

10. Literaturverzeichnis

1. Agarwal R, Chaudhary M, Bohra S, Bajaj S (2016) Evaluation of natural killer cell (CD57) as a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemistry study. J Oral Maxillofac Pathol 20:173. https://doi.org/10.4103/0973-029X.185933
2. Ammon J, Karstens JH, Rathert P (1981) Urologische Onkologie: radiologische Diagnostik und Strahlentherapie ; mit 74 Tabellen, 2., [korrigierte] Aufl. Springer, Berlin
3. Ang KK, Harris J, Wheeler R et al (2010) Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. N Engl J Med 363:24–35. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217
4. Arenz A, Ziemann F, Mayer C et al (2014) Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. Strahlenther Onkol 190:839–846. https://doi.org/10.1007/s00066-014-0605-5
5. Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS (2006) E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain *via* its first hydrophobic domain: HPV-16 E5 and MHC Class I. Int J Cancer 119:2105–2112. https://doi.org/10.1002/ijc.22089
6. Bastian T, Lang S, Kansy BA (2020) Vergleich der T-Zell-Antwort im Tumormilieu von Patienten mit HPV+- und HPV−-Kopf-Hals-Karzinom. HNO 68:80–86. https://doi.org/10.1007/s00106-019-00804-0
7. Bellora F, Castriconi R, Dondero A et al (2014) Human NK cells and NK receptors. Immunol Lett 161:168–173. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.12.009
8. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2013) Stryer Biochemie. https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2989-6
9. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B et al (1987) The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. Nature 329:512–518. https://doi.org/10.1038/329512a0
10. Broders AC (1920) SQUAMOUS-CELL EPITHELIOMA OF THE LIP: A STUDY OF FIVE HUNDRED AND THIRTY-SEVEN CASES. J Am Med Assoc 74:656. https://doi.org/10.1001/jama.1920.02620100016007
11. Bryceson YT, Fauriat C, Nunes JM et al (2010) Functional Analysis of Human NK Cells by Flow Cytometry. In: Campbell KS (Hrsg) Nat. Kill. Cell Protoc. Humana Press, Totowa, NJ, S 335–352

12. Campo MS, Graham SV, Cortese MS et al (2010) HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. Virology 407:137–142. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.044

13. Cheng C-C, Lin H-C, Chiang Y-W et al (2021) Nicotine exhausts CD8+ T cells against tumor cells through increasing miR-629-5p to repress IL2RB-mediated granzyme B expression. Cancer Immunol Immunother 70:1351–1364. https://doi.org/10.1007/s00262-020-02770-x

14. Cohen N, Fedewa S, Chen AY (2018) Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. Oral Maxillofac Surg Clin N Am 30:381–395. https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.06.001

15. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol 22:633–640. https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9

16. Cox DR (1972) Regression Models and Life-Tables. J R Stat Soc Ser B Methodol 34:187–202. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1972.tb00899.x

17. De Meulenaere A, Vermassen T, Aspeslagh S et al (2017) Prognostic markers in oropharyngeal squamous cell carcinoma: focus on CD70 and tumour infiltrating lymphocytes. Pathology (Phila) 49:397–404. https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.02.002

18. Doorbar J, Quint W, Banks L et al (2012) The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. Vaccine 30:F55–F70. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083

19. Edge SB, American Joint Committee on Cancer (2010) AJCC cancer staging manual, 7th ed. Springer, New York

20. Embree BG, Whitehead PC (1993) Validity and reliability of self-reported drinking behavior: dealing with the problem of response bias. J Stud Alcohol 54:334–344. https://doi.org/10.15288/jsa.1993.54.334

21. Engelhardt D, Fürst D, Tsamadou C et al (2021) Differentielles HLA-Allelfrequenzmuster zwischen Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC) und gesunden Kontrollen sowie HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC-Patienten. HNO-Online-Kongress, S s-0041-1727856

22. Esteller M (2005) ABERRANT DNA METHYLATION AS A CANCER-INDUCING MECHANISM. Annu Rev Pharmacol Toxicol 45:629–656. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095832

23. Fakhry C, Westra WH, Li S et al (2008) Improved Survival of Patients With Human

Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial. JNCI J Natl Cancer Inst 100:261–269. https://doi.org/10.1093/jnci/djn011

24. Ferenčik M, Zervan K (2006) Kompendium der Immunologie: Grundlagen und Klinik. Springer, Wien

25. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J et al (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer 49:1374–1403. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027

26. Garaycoechea JI, Crossan GP, Langevin F et al (2018) Alcohol and endogenous aldehydes damage chromosomes and mutate stem cells. Nature 553:171–177. https://doi.org/10.1038/nature25154

27. Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F (2003) MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. J Cell Physiol 195:346–355. https://doi.org/10.1002/jcp.10290

28. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Aptsiauri N (2017) Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma. Cancer Immunol Immunother 66:259–271. https://doi.org/10.1007/s00262-016-1947-x

29. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T et al (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. Immunol Today 18:89–95. https://doi.org/10.1016/S0167-5699(96)10075-X

30. Gissmann L, Hausen HZ (1976) Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. Proc Natl Acad Sci 73:1310–1313. https://doi.org/10.1073/pnas.73.4.1310

31. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The Hallmarks of Cancer. Cell 100:57–70. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9

32. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144:646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

33. Harden ME, Munger K (2017) Human papillomavirus molecular biology. Mutat Res Rev Mutat Res 772:3–12. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.002

34. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S et al (2007) Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. JNCI J Natl Cancer Inst 99:777–789. https://doi.org/10.1093/jnci/djk179

35. zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2:342–350. https://doi.org/10.1038/nrc798

36. Heinrich PC, Müller M, Graeve L (2014) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3

37. Hewitt EW (2003) The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. Immunology 110:163–169. https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x

38. Hiddemann W, Bartram CR (2010) Die Onkologie. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79725-8

39. Johnson DE, Burtness B, Leemans CR et al (2020) Head and neck squamous cell carcinoma. Nat Rev Dis Primer 6:92. https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3

40. Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet 3:415–428. https://doi.org/10.1038/nrg816

41. Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. J Am Stat Assoc 53:457–481. https://doi.org/10.1080/01621459.1958.10501452

42. Karakousis CP (2015) Atlas of Operative Procedures in Surgical Oncology. Springer New York : Imprint : Springer, New York, NY

43. Kaufman J (2018) Unfinished Business: Evolution of the MHC and the Adaptive Immune System of Jawed Vertebrates. Annu Rev Immunol 36:383–409. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052450

44. Kenter GG, Welters MJP, Valentijn ARPM et al (2009) Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia. N Engl J Med 361:1838–1847. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810097

45. Koene G, Mulder A, van der Ven K et al (2006) Human Monoclonal Antibodies as a Tool for the Detection of HLA Class I Allele-Specific Expression Loss in Head-and-Neck Squamous Cell Carcinoma and Corresponding Lymph Node Metastases. Hum Immunol 67:692–699. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.06.001

46. Lampson LA, Fisher CA, Whelan JP (1983) Striking paucity of HLA-A, B, C and beta 2-microglobulin on human neuroblastoma cell lines. J Immunol Baltim Md 1950 130:2471–2478

47. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH (2011) The molecular biology of head and neck cancer. Nat Rev Cancer 11:9–22. https://doi.org/10.1038/nrc2982

48. Li C, Zhao L, Wang Q et al (2019) Neutrophils infiltration and its correlation with human papillomavirus status in the oral squamous cell carcinoma. Cancer Manag Res Volume 11:5171–5185. https://doi.org/10.2147/CMAR.S202465

49. Liao N, Bix M, Zijlstra M et al (1991) MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. Science 253:199–202. https://doi.org/10.1126/science.1853205

50. Lingen MW, Kalmar JR, Karrison T, Speight PM (2008) Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. Oral Oncol 44:10–22. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2007.06.011

51. Ljunggren H-G, Kärre K (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. Immunol Today 11:237–244. https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90097-S

52. Löning T, Ikenberg H, Becker J et al (1985) Analysis of Oral Papillomas, Leukoplakias, and Invasive Carcinomas for Human Papillomavirus Type Related DNA. J Invest Dermatol 84:417–420. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12265517

53. Louvanto K, Sarkola M, Rintala M et al (2017) Breast Milk Is a Potential Vehicle for Human Papillomavirus Transmission to Oral Mucosa of the Spouse: Pediatr Infect Dis J 36:627–630. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001546

54. Lutz WK (1990) Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis. Mutat Res Genet Toxicol 238:287–295. https://doi.org/10.1016/0165-1110(90)90020-C

55. Malherbe DC, Messaoudi I (2022) Transcriptional and Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Dysfunction by Chronic Alcohol Consumption. Front Immunol 13:911951. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.911951

56. Mandal R, Şenbabaoğlu Y, Desrichard A et al (2016) The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. JCI Insight. https://doi.org/10.1172/jci.insight.89829

57. Marchetti B, Ashrafi GH, Tsirimonaki E et al (2002) The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. Oncogene 21:7808–7816. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205885

58. McLaughlin-Drubin ME, Munger K (2008) Viruses associated with human cancer. Biochim Biophys Acta 1782:127–150. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.12.005

59. McLaughlin-Drubin ME, Münger K (2009) The human papillomavirus E7 oncoprotein. Virology 384:335–344. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.006

60. Moody CA, Laimins LA (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nat Rev Cancer 10:550–560. https://doi.org/10.1038/nrc2886

61. Nair MPN, Kronfol ZA, Schwartz SA (1990) Effects of alcohol and nicotine on cytotoxic functions of human lymphocytes. Clin Immunol Immunopathol 54:395–409. https://doi.org/10.1016/0090-1229(90)90053-S

62. Näsman A, Andersson E, Marklund L et al (2013) HLA Class I and II Expression in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Relation to Tumor HPV Status and Clinical Outcome. PLoS ONE 8:e77025. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077025

63. Neumann J (2008) Immunbiologie: eine Einführung. Springer, Berlin

64. Oguejiofor K, Hall J, Slater C et al (2015) Stromal infiltration of CD8 T cells is associated with improved clinical outcome in HPV-positive oropharyngeal squamous carcinoma. Br J Cancer 113:886–893. https://doi.org/10.1038/bjc.2015.277

65. Oken MM, Creech RH, Tormey DC et al (1982) Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 5:649–655

66. Owosho AA, Wiley R, Stansbury T et al (2018) Trends in Human Papillomavirus-Related Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Incidence, Vermont 1999–2013. J Community Health 43:731–737. https://doi.org/10.1007/s10900-018-0477-1

67. Paaso A, Jaakola A, Syrjänen S, Louvanto K (2019) From HPV Infection to Lesion Progression: The Role of HLA Alleles and Host Immunity. Acta Cytol 63:148–158. https://doi.org/10.1159/000494985

68. Pamer E, Cresswell P (1998) MECHANISMS OF MHC CLASS I–RESTRICTED ANTIGEN PROCESSING. Annu Rev Immunol 16:323–358. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.323

69. Partlová S, Bouček J, Kloudová K et al (2015) Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. OncoImmunology 4:e965570. https://doi.org/10.4161/21624011.2014.965570

70. Pearson K (1900) X. *On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling*. Lond Edinb Dublin Philos Mag J Sci 50:157–175. https://doi.org/10.1080/14786440009463897

71. Porter SS, Stepp WH, Stamos JD, McBride AA (2017) Host cell restriction factors that limit transcription and replication of human papillomavirus. Virus Res 231:10–20. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.014

72. Prigge E-S, Arbyn M, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M (2017) Diagnostic accuracy of p16 ^{INK4a} immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell

carcinomas: A systematic review and meta-analysis: Meta-analysis on p16 immunohistochemistry in oropharyngeal cancer. Int J Cancer 140:1186–1198. https://doi.org/10.1002/ijc.30516

73. Prigge E-S, Toth C, Dyckhoff G et al (2015) p16 ^{INK4a} /Ki-67 co-expression specifically identifies transformed cells in the head and neck region: p16 ^{INK4a} /Ki-67 and HPV in head and neck cancer. Int J Cancer 136:1589–1599. https://doi.org/10.1002/ijc.29130

74. Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ et al (2013) HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. Radiother Oncol 107:242–246. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.03.013

75. Rintala M, Grenman S, Puranen M, Syrjanen S (2006) Natural history of oral papillomavirus infections in spouses: A prospective Finnish HPV Family Study. J Clin Virol 35:89–94. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.05.012

76. Rivera C (2015) Essentials of oral cancer. Int J Clin Exp Pathol 8:11884–11894

77. Robert Koch-Institut (2016) Alkoholkonsum von Erwachsenen in Deutschland: Riskante Trinkmengen, Folgen und Maßnahmen. https://doi.org/10.17886/RKI-GBE-2016-025

78. Sacks R, Law JY, Zhu H et al (2020) Unique Patterns of Distant Metastases in HPV-Positive Head and Neck Cancer. Oncology 98:179–185. https://doi.org/10.1159/000504651

79. Safi A-F, Grochau K, Drebber U et al (2019) A novel histopathological scoring system for patients with oral squamous cell carcinoma. Clin Oral Investig. https://doi.org/10.1007/s00784-019-02804-4

80. Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A et al (2000) Golgi Alkalinization by the Papillomavirus E5 Oncoprotein. J Cell Biol 148:305–316. https://doi.org/10.1083/jcb.148.2.305

81. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N et al (2016) Carcinogenic human papillomavirus infection. Nat Rev Dis Primer. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86

82. Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K (2006) Kompendium Internistische Onkologie. https://doi.org/10.1007/3-540-31303-6

83. Seitz HK, Becker P (2007) Alcohol metabolism and cancer risk. Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol 30:38–41, 44–47

84. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E-JM et al (2007) A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen.

Int J Cancer 121:2465–2472. https://doi.org/10.1002/ijc.22980

85. Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF (2016) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48678-8

86. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M et al (1983) Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. Int J Oral Surg 12:418–424

87. Syrjänen S (2007) Human Papillomaviruses in Head and Neck Carcinomas. N Engl J Med 356:1993–1995. https://doi.org/10.1056/NEJMe078004

88. Syrjänen S (2018) Oral manifestations of human papillomavirus infections. Eur J Oral Sci 126 Suppl 1:49–66. https://doi.org/10.1111/eos.12538

89. Syrjänen S, Syrjänen K (2019) HPV in Head and Neck Carcinomas: Different HPV Profiles in Oropharyngeal Carcinomas – Why? Acta Cytol 63:124–142. https://doi.org/10.1159/000495727

90. Thomas KJ, Smith KL, Youde SJ et al (2008) HPV16 E629-38-specific T cells kill cervical carcinoma cells despite partial evasion of T-cell effector function. Int J Cancer 122:2791–2799. https://doi.org/10.1002/ijc.23475

91. Toh Y, Oki E, Ohgaki K et al (2010) Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis. Int J Clin Oncol 15:135–144. https://doi.org/10.1007/s10147-010-0057-6

92. Varela-Rey M, Woodhoo A, Martinez-Chantar M-L et al (2013) Alcohol, DNA methylation, and cancer. Alcohol Res Curr Rev 35:25–35

93. Vici P, Pizzuti L, Mariani L et al (2016) Targeting immune response with therapeutic vaccines in premalignant lesions and cervical cancer: hope or reality from clinical studies. Expert Rev Vaccines 15:1327–1336. https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1176533

94. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA (2015) Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. Nat Rev Immunol 15:388–400. https://doi.org/10.1038/nri3839

95. Wagner S, Böckmann H, Gattenlöhner S et al (2018) Das angeborene Immunsystem beim Oropharynxkarzinom: Immunmodulation durch HPV. HNO 66:301–307. https://doi.org/10.1007/s00106-018-0480-y

96. Wagner S, Prigge E-S, Wuerdemann N et al (2020) Evaluation of p16INK4a expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers

for treatment de-escalation. Br J Cancer 123:1114–1122. https://doi.org/10.1038/s41416-020-0964-x

97. Wagner S, Reder H, Sharma SJ et al (2018) Das HPV-getriebene Oropharynxkarzinom – Inzidenz, Trends, Diagnose und Therapie. Urol 57:1457–1463. https://doi.org/10.1007/s00120-018-0810-4

98. Wagner S, Wittekindt C, Reuschenbach M et al (2016) CD56-positive lymphocyte infiltration in relation to human papillomavirus association and prognostic significance in oropharyngeal squamous cell carcinoma: CD56-Positive Lymphocytes and HPV in Oropharyngeal Cancer. Int J Cancer 138:2263–2273. https://doi.org/10.1002/ijc.29962

99. Wagner S, Würdemann N, Hübbers C et al (2015) HPV-assoziierte Kopf-Hals-Karzinome: Mutationssignaturen und genomische Aberrationen. HNO 63:758–767. https://doi.org/10.1007/s00106-015-0074-x

100. Wang M, McIntee EJ, Cheng G et al (2000) Identification of DNA Adducts of Acetaldehyde. Chem Res Toxicol 13:1149–1157. https://doi.org/10.1021/tx000118t

101. Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L (2013) Emerging patterns of somatic mutations in cancer. Nat Rev Genet 14:703–718. https://doi.org/10.1038/nrg3539

102. Westrich JA, Vermeer DW, Silva A et al (2019) CXCL14 suppresses human papillomavirus-associated head and neck cancer through antigen-specific CD8+ T-cell responses by upregulating MHC-I expression. Oncogene 38:7166–7180. https://doi.org/10.1038/s41388-019-0911-6

103. Wittekind C, International Union against Cancer (2012) TNM: Klassifikation maligner Tumoren, 7. Aufl., 4., korr. Nachdr. Wiley-Blackwell, Weinheim

104. Wittekind Ch, Sobin LH, Klimpfinger M (2005) TNM-Atlas. https://doi.org/10.1007/b137945

105. Wittekindt C, Klussmann JP (2017) Tumor Staging and HPV-Related Oropharyngeal Cancer. In: Golusiński W, Leemans CR, Dietz A (Hrsg) HPV Infect. Head Neck Cancer. Springer International Publishing, Cham, S 123–133

106. Wittekindt C, Wagner S, Bushnak A et al (2019) Increasing Incidence rates of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Germany and Significance of Disease Burden Attributed to Human Papillomavirus. Cancer Prev Res Phila Pa 12:375–382. https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0098

107. Wittekindt C, Wagner S, Klußmann JP (2011) Humane Papillomaviren bei Kopf-Hals-Karzinomen: Molekulare und translationale Grundlagen. HNO 59:885–892. https://doi.org/10.1007/s00106-011-2357-1

108. Wittekindt C, Wagner S, Mayer C, Klußmann J (2012) Grundlagen der Tumorentstehung und die Bedeutung Humaner Papillomaviren (HPV) bei Kopf-Hals-Karzinomen. Laryngo-Rhino-Otol 91:S1–S26. https://doi.org/10.1055/s-0031-1297241

109. Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS, Klussmann JP (2012) Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. GMS Curr Top Otorhinolaryngol - Head Neck Surg 11Doc09 ISSN 1865-1011. https://doi.org/10.3205/cto000091

110. Wittekindt C, Wagner S, Sharma S et al (2018) HPV – Das andere Kopf-Hals-Karzinom. Laryngo-Rhino-Otol 97:S48–S113. https://doi.org/10.1055/s-0043-121596

111. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS et al (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. Semin Cancer Biol 14:473–486. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.06.010

112. Wolff K-D, Bootz F, Beck J et al (2012) Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms.

113. Yim E-K, Park J-S (2005) The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. Cancer Res Treat 37:319. https://doi.org/10.4143/crt.2005.37.6.319

114. Zhang J, Jin S, Li X et al (2019) Human Papillomavirus Type 16 Disables the Increased Natural Killer Cells in Early Lesions of the Cervix. J Immunol Res 2019:1–8. https://doi.org/10.1155/2019/9182979

115. Zinkernagel RM, Doherty PC (1979) MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. Adv Immunol 27:51–177

11. Anhang

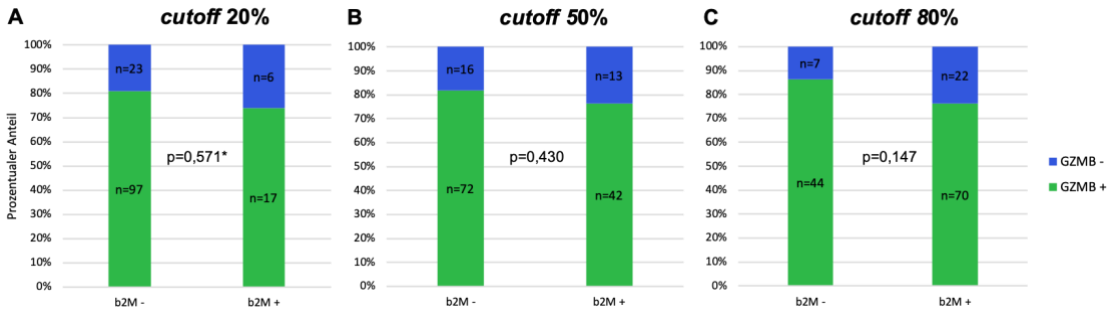
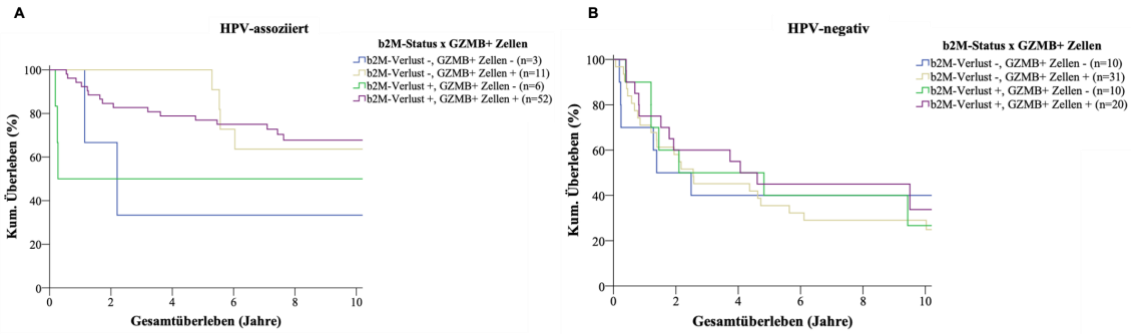


Abb. A 1 Verteilung der GZMB+ Fälle nach dem b2M-Verlust aufgetrennt: (A-C) bei keinem der verwendeten *cutoff*-Werte zeigt sich eine Assoziation zwischen dem b2M-Verlust und dem Vorhandensein GZMB+ Zellen. p: p-Wert (Chi-Quadrat-Test oder (*) Exakter Test nach Fisher). („GZMB -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB +“ GZMB+ Zellen vorhanden)



C

b2M-Verlust x GZMB+ Zellen	b2M-Verlust -, GZMB+ Zellen -	b2M-Verlust +, GZMB+ Zellen -	b2M-Verlust -, GZMB+ Zellen +	b2M-Verlust +, GZMB+ Zellen +
b2M-Verlust -, GZMB+ Zellen -	-	0,655	0,121	0,127
b2M-Verlust +, GZMB+ Zellen -	0,655	-	0,125	**0,017**
b2M-Verlust -, GZMB+ Zellen +	0,121	0,125	-	0,909
b2M-Verlust +, GZMB+ Zellen +	0,127	**0,017**	0,909	-

D

b2M-Verlust x GZMB+ Zellen	b2M-Verlust -, GZMB+ Zellen -	b2M-Verlust +, GZMB+ Zellen -	b2M-Verlust -, GZMB+ Zellen +	b2M-Verlust +, GZMB+ Zellen +
b2M-Verlust -, GZMB+ Zellen -	-	0,960	0,756	0,660
b2M-Verlust +, GZMB+ Zellen -	0,960	-	0,682	0,747
b2M-Verlust -, GZMB+ Zellen +	0,756	0,682	-	0,406
b2M-Verlust +, GZMB+ Zellen +	0,660	0,747	0,406	-

Abb. A 2 Gesamtüberleben stratifiziert nach der Kombinationsvariable aus dem b2M-Status sowie dem Vorhandensein GZMB+ Zellen in Abhängigkeit vom HPV-Status: (A) Patienten mit einem HPV-assoziierten OSCC haben bei Vorliegen eines b2M-Verlustes einen Überlebensvorteil nur in Kombination mit dem Nachweis GZMB+ Zellen (p-Werte nach Log-Rank-Test in (C) dargestellt). (B) bei HPV-negativen OSCC ergibt sich aus keiner der Kombinationen ein Überlebensvorteil, p-Werte nach Log-Rank-Test in (D) dargestellt). („b2M-Verlust -“ b2M-Verlust ≤50%, „b2M-Verlust +“ b2M-Verlust >50%, „GZMB+ Zellen -“ GZMB+ Zellen nicht vorhanden, „GZMB+ Zellen +“ GZMB+ Zellen vorhanden)

12. Publikationsverzeichnis

Evers SC, Wagner S, Wittekindt C, Thevarajah M, Gattenlöhner S, Dreyer T, Bräuninger A, Reuschenbach M, Klußmann JP: Assoziation eines MHC I-Verlustes mit der Lokalisation und Anzahl zytotoxischer NK-Zellen im HPV-assoziierten Oropharynxkarzinom (OSCC), Meeting Abstract zur 86. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Berlin, 13.-16.05.2015. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2015. Doc15hnod186. Doi: 10.3205/15hnod186

13. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.
Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.
Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt.
Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.
Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt.
Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift

14. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich herzlich all denjenigen Personen danken, die für die Anfertigung dieser Arbeit unerlässlich waren und mich in meinem bisherigen Werdegang immer begleitet und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. C. Wittekindt für die hervorragende Betreuung bedanken. Nicht nur die Zusammenarbeit während dieser Arbeit, sondern auch in den gemeinsamen Lehrprojekten haben mich stets positiv beeinflusst und meinen akademischen Werdegang in großem Maße geprägt.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei dem Betreuer dieser Arbeit, Herrn Dr. rer. nat. S. Wagner. Ohne die großartige Unterstützung im Labor wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Daher gilt mein Dank ebenso Frau J. Knuth sowie M. Roth, die mich sehr herzlich im Labor aufgenommen und mir die naturwissenschaftlich-experimentellen Arbeitsweisen beigebracht haben.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. med. M. von Knebel-Doeberitz aus dem Institut für Pathologie der Abteilung für angewandte Tumorbiologie des Universitätsklinikums Heidelberg für die Bereitstellung des Antikörpers „L368“ sowie die Bestimmung des HPV-Status der verwendeten Tumor-Präparate.

Der gesamten Abteilung der Klinik für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie und insbesondere Herrn Prof. Dr. med. J.-P. Klußmann gilt mein herzlichster Dank für die großartige Begleitung während meiner Zeit als studentische Hilfskraft und Doktorandin.

Meinen Eltern und Verwandten möchte ich ganz besonders herzlich für die Unterstützung während meines gesamten Studiums danken. Meinem Ehemann B. Tosun danke ich von ganzem Herzen für die uneingeschränkte Unterstützung, Liebe und Motivation.

Darüber hinaus danke ich meinen Freunden und Kollegen, die mir immer zur Seite standen und mich ebenso in fachlichen Gesprächen stets motiviert und angespornt haben.