

**Die prognostische Bedeutung von humanen  
Papillomaviren und der PD-L1- Expression bei  
Metastasen eines Plattenepithelkarzinoms  
unbekannten Ursprungs im Kopf-Hals-Bereich**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Susanne Marion Reiser, geb. Herter  
aus Stuttgart

Gießen (2023)

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

HNO-Tumorforschung

Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Claus Wittekindt

Gutachter: Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner

Tag der Disputation: Mittwoch, 02.10.2024

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	CUP-Syndrom.....	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Pathogenese.....	1
1.1.3	Epidemiologie.....	2
1.1.3.1	Epidemiologie des CUP-Syndroms allgemein.....	2
1.1.3.2	Epidemiologie von CUP im Kopf-Hals-Bereich.....	3
1.1.4	Risikofaktoren.....	3
1.1.5	Symptome.....	4
1.1.6	Diagnose.....	4
1.1.7	Therapie.....	7
1.2	HPV.....	8
1.2.1	HPV-Klassifikation.....	8
1.2.2	Aufbau des HPV.....	9
1.2.3	Der Replikationszyklus von HPV.....	11
1.2.4	P16 <sup>INK4a</sup> .....	12
1.2.5	HPV-Nachweis.....	13
1.3	PD-1/PD-L1.....	15
1.3.1	Physiologische Funktion des PD-1/PD-L1-Signalwegs.....	15
1.3.2	PD-1/PD-L1 in Tumorgewebe.....	16
1.3.3	Weitere Checkpoint-Immunmarker.....	16
1.3.4	Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren.....	17
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	19
1.4.1	Hintergrund und Relevanz der Dissertation.....	19
1.4.2	Fragestellung.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Patientenkollektiv: Ein- und Ausschlusskriterien.....	20
2.1.1	Datenerfassung.....	20
2.2	Gewebeproben.....	21
2.2.1	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe.....	21
2.2.2	Proben und Gewebeschnitte.....	22
2.2.2.1	HE-Färbung.....	22

# Inhalt

---

2.3	HPV-Nachweis.....	22
2.3.1	PCR.....	23
2.3.2	HPV-mRNA.....	23
2.3.3	P16 <sup>INK4a</sup> -IHC-Färbung.....	23
2.4	Biomarker-Expression.....	23
2.4.1	PD-L1-Färbung.....	23
2.4.1.1	Vorversuche.....	23
2.4.2	Tissue Microarrays.....	25
2.4.2.1	PD-L1-Antikörper.....	26
2.4.3	MHC I, MHC II und LAG 3.....	26
2.5	Statistik.....	26
2.6	Ethik-Votum.....	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Klinische Parameter.....	28
3.1.1	TNM-Kategorie.....	28
3.1.2	Prognose.....	29
3.2	HPV.....	30
3.2.1	HPV-Analyse.....	30
3.2.2	HPV- und p16-Prävalenz bei CUP <sub>HNSCC</sub> in verschiedenen Studien.....	32
3.2.3	Zeitliche Entwicklung der CUP <sub>HNSCC</sub> -Fallzahlen.....	33
3.3	Biometrie und Lebensstil-Risikofaktoren im gesamten Kollektiv und in Bezug zum HPV-Status.....	36
3.3.1	Alter und Geschlecht.....	36
3.3.2	ECOG.....	37
3.3.3	BMI.....	38
3.3.4	Noxen.....	39
3.3.5	Übersicht der biometrischen Faktoren in Bezug zum HPV-Status.....	40
3.4	Tumorcharakteristika, Krankheitsverlauf und Therapie im gesamten Kollektiv und in Bezug zum HPV-Status.....	41
3.4.1	N-Status.....	41
3.4.2	Krankheitsverlauf.....	41
3.4.3	Therapie.....	42
3.4.4	Übersicht von Tumorcharakteristika, Therapie und Krankheitsverlauf.....	44
3.5	Routine Laborparameter im gesamten Kollektiv und in Bezug zum HPV-Status.....	45

# Inhalt

---

3.6	Zelluläre Biomarker im gesamten Kollektiv und in Bezug zum HPV-Status	47
3.6.1	PD-L1	47
3.6.1.1	PD-L1-Färbung im Vergleich	47
3.6.1.2	PD-L1 im gesamten Kollektiv	48
3.6.2	MHC I, MHC II, LAG 3	49
3.6.3	Übersicht der zellulären Biomarker	51
3.7	Tumorcharakteristika von CUP <sub>HNSCC</sub> im Vergleich zu oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen	51
3.8	Prognostisch relevante Faktoren mit Einfluss auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub>	53
3.8.1	Überlebenszeit in Abhängigkeit vom HPV-Status	53
3.8.2	Überlebenszeit in Abhängigkeit vom ECOG-Status und BMI	54
3.8.3	Überlebenszeit in Abhängigkeit von Nikotin- und Alkoholabusus	55
3.8.4	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Tumorgröße, Fernmetastasierung und dem Erkrankungsverlauf	56
3.8.5	Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Therapie	58
3.8.6	Überlebenszeit in Abhängigkeit von den Laborparametern	58
3.8.7	Überlebenszeit in Abhängigkeit von PD-L1	60
3.8.8	Überlebenszeit in Abhängigkeit von MHC I, MHC II und LAG 3	61
3.9	Faktoren mit prognostischer Relevanz bei CUP <sub>HNSCC</sub>	62
3.9.1	Multivariate Analyse	64
3.9.2	Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> , stratifiziert nach dem HPV-Status	66
4	Diskussion	69
4.1	HPV-Status des CUP <sub>HNSCC</sub> -Kollektivs	69
4.2	HPV-Prävalenz bei CUP <sub>HNSCC</sub>	70
4.3	Tumorcharakteristika von CUP <sub>HNSCC</sub> im Vergleich zu KHT	71
4.4	Entwicklung der Fallzahlen im zeitlichen Verlauf	72
4.5	Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub>	73
4.5.1	Der HPV-Status als Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben und dessen Auswirkungen auf die Therapie	73
4.5.2	Nikotin und Alkohol als Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben	75
4.5.3	Entzündungsparameter, ECOG-Status und Tumorgröße als Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben	76
4.5.4	Die Therapieform als Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben	78
4.6	PD-L1 beim CUP <sub>HNSCC</sub> -Syndrom	79

# Inhalt

---

4.7	Weitere Immunbiomarker: LAG 3 und MHC I .....	81
5	Zusammenfassung.....	83
6	Summary .....	84
7	Abkürzungsverzeichnis.....	85
8	Abbildungsverzeichnis.....	87
9	Tabellenverzeichnis .....	89
10	Literaturverzeichnis .....	90
11	Anhang.....	106
11.1	SOP – Herstellung Gewebeschnitte .....	106
11.2	SOP –HE-Färbung.....	107
12	Publikationsverzeichnis .....	108
13	Ehrenwörtliche Erklärung .....	109
14	Danksagung.....	110

# 1 Einleitung

## 1.1 CUP-Syndrom

### 1.1.1 Definition

Die Diagnose des CUP-Syndroms (*cancer of unknown primary*/ Krebserkrankung mit unbekanntem Primärtumor) ist eine Erkrankung, bei der eine Metastase gefunden wird, wobei der eigentliche Primärtumor nicht detektiert werden kann. Es handelt sich daher um eine schwierige Ausschlussdiagnose und es finden sich unterschiedliche Begriffsbestimmungen in der Literatur (Strumberg et al. 2007), welche alle jedoch folgende Kriterien gemein haben: Ersten handelt es sich nach histologischer oder zytologischer Sicherung des Malignoms um eine Metastase, wobei die Untersuchungsergebnisse nicht mit einem Primärtumor vereinbar sind. Zweitens kann auch nach umfangreicher Suche kein Primärtumor detektiert werden (Zaun et al. 2018; Bochtler et al. 2023). Beim CUP-Syndrom im Kopf-Hals-Bereich (*head-neck-CUP* (<sup>HN</sup>CUP)) sind sich die Metastasen in den Halslymphknoten nachweisbar.

### 1.1.2 Pathogenese

CUPs können an nahezu jeder Lokalisation im Körper auftreten. Die Pathogenese ist bislang nicht vollständig geklärt. Es existieren verschiedene Theorien zur Ätiologie und Pathogenese, welche alle weitgehend hypothetischer Natur sind (Hübner et al. 2023). Ein Ansatz geht davon aus, dass grundsätzlich ein Primärtumor existiert. In diesem Fall könnte er ungewöhnlich klein oder durch eine Immunreaktion soweit supprimiert worden sein, dass der Primarius mit der aktuell zur Verfügung stehenden Diagnostik nicht (mehr) detektierbar ist (Löffler und Krämer 2016). Ein anderer Erklärungsansatz ist, dass der Primärtumor tatsächlich nicht existiert. Das Malignom entsteht demnach durch eine Streuung prämaligener Zellen oder der malignen Transformation von ektopem Gewebe. Auch die unbemerkte Entfernung, des Primarius zum Beispiel als Naevus oder als Adenom, ist denkbar. Bei manchen Geweben ist die Unterscheidung zwischen Metastase und Primärtumor sehr schwierig und das Gewebe kann selbst von erfahrenen Pathologen falsch interpretiert werden. Dadurch kann das als Metastase identifizierte Gewebe in Wirklichkeit ein Primärtumor sein. Ein Beispiel hierfür sind die Schweißdrüsenkarzinome, welche leicht fehlinterpretiert und als Adeno-CUP klassifiziert werden können. (Löffler und Krämer 2016)

### 1.1.3 Epidemiologie

#### 1.1.3.1 Epidemiologie des CUP-Syndroms allgemein

Etwa 2-8% aller Tumorerkrankungen sind ein CUP-Syndrom. Das CUP-Syndrom ist eine sehr heterogene Gruppe unter den malignen Erkrankungen (Pavlidis und Plataniotis 2016). Starke Schwankungen bei der Prävalenz sind u.a. der ungenauen Definition, uneinheitlichem diagnostischem Vorgehen und dem Vorkommen bei allen Entitäten geschuldet. So ist das CUP-Syndrom im ICD-10 mit diversen Diagnosecodes vertreten. Unter der ICD-10-Gruppe C76-C80 sind „Bösartige Neubildungen ungenau bezeichneter, sekundärer und nicht näher bezeichneter Lokalisationen“ zusammengefasst (DIMDI 2019). CUPs finden sich also unter verschiedenen ICD-10-Diagnosecodes wieder, welche jedoch nicht ausschließlich für das Krankheitsbild CUP-Syndrom definiert sind. Dies erschwert die Datenerhebung und Forschung zum CUP-Syndrom, da die Zuordnung in großen Forschungsdatenbanken und Krebs- bzw. Sterberegistern oft ausschließlich über den ICD-10-Code erfolgt. Es bedarf einer genauen Prüfung, hinter welchem Fall sich wirklich ein CUP verbirgt. Beispielsweise kann ein ICD-Code C76-C80 auch verwendet werden, wenn die genaue Lokalisation (noch) nicht bestimmt werden konnte, jedoch weiterführende Diagnostik vom Patienten aus persönlichen Gründen abgelehnt wird. Selbst den offiziellen Krebsregistern wie dem Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert Koch-Institut liegen aus oben genannten Gründen nur wenige detaillierte Daten zum CUP-Syndrom vor. Definitionsbedingt und durch uneindeutige ICD-10-Codes entstehen heterogene Kollektive, welche die Vergleichbarkeit zwischen den CUP-Studien erschweren (Kraywinkel und Zeissig 2017) .

Männer und Frauen sind allgemein etwa gleich häufig betroffen, wobei die Anzahl der Erkrankten im Alter jeweils ansteigt. Auch die Mortalität nimmt mit steigendem Alter bei Erstdiagnose signifikant zu (Löffler und Krämer 2017).

Aus histopathologischer Sicht handelt es sich in 50-70% der CUP-Fälle um ein Adenokarzinom, 20-30% sind undifferenzierte Karzinome und 5-8% sind Plattenepithelkarzinome. Neuroendokrine Karzinome und undifferenzierte Tumoren machen nur einen geringen Anteil von etwa 2-4% der CUP-Fälle aus (Krämer und Löffler 2016).

In Deutschland sind die Inzidenz und Prävalenz beim CUP-Syndrom von 2003 bis 2014 stabil (Kraywinkel und Zeissig 2017). In den USA konnte in einer großen retrospektiven

Studie mit über 100.000 Patienten, die zwischen 1970 bis 2008 erfasst wurden, ein kontinuierlicher Rückgang der Inzidenz und Prävalenz von CUP verzeichnet werden (Urban et al. 2013).

### 1.1.3.2 Epidemiologie von CUP im Kopf-Hals-Bereich

Die Prävalenz ist beim <sup>HN</sup>CUP ähnlich zum CUP-Syndrom im Allgemeinen und macht einen Anteil von ca. 3 bis 9% aller Kopf-Hals-Tumore (KHT) aus (Zhuang et al. 2014). In weiteren Eigenschaften unterscheidet sich <sup>HN</sup>CUP jedoch vom CUP-Syndrom im Allgemeinen und zeigt Parallelen zu anderer KHT: Es handelt es sich in 70-80% der Fälle um ein Plattenepithelkarzinom, welches im Vergleich zum Adeno-CUP eine deutlich günstigere Prognose hat (Sanderson und Ironside 2002; Zhuang et al. 2014; Löffler und Krämer 2017). Die Geschlechterverteilung ist ebenfalls vergleichbar mit der anderer KHT: Männer sind gegenüber Frauen deutlich häufiger betroffen mit einem Verhältnis von ca. 4:1. Dies erklärt sich am wahrscheinlichsten durch den – insbesondere in der Vergangenheit – höheren Konsum von Nikotin und Alkohol bei Männern (Pavlidis und Plataniotis 2016). Die Erstdiagnose wird am häufigsten zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr gestellt (Jereczek-Fossa et al. 2004).

### 1.1.4 Risikofaktoren

Nikotin- und Alkoholabusus sind die bedeutenden Risikofaktoren für die Entstehung des Kopf-Hals-Plattenepithel-CUP (CUP<sub>HNSCC</sub>). Generell sind diese Stoffe bei hohem und regelmäßigem Genuss auch als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms im Kopf- und Halsbereich bekannt. Man geht davon aus, dass bis zu 85% der Neuerkrankungen durch Rauchen verursacht werden (Wittekindt et al. 2012). Die karzinogene Wirkung von Alkohol selbst ist umstritten. Alkoholabbauprodukte wie Acetaldehyd sowie sekundär mit Alkohol assoziierte Faktoren können die Wirkung anderer Karzinogene verstärken und so als Tumorpromotor fungieren (Homann 2000; WHO 2020). In Kombination wirken Nikotin und Alkohol synergistisch: Nikotin hat einen genotoxischen Effekt auf die DNA, während Alkoholmetabolite wie Acetaldehyd die Reparaturmechanismen der DNA stören. Zudem wirkt Alkohol als Lösungsmittel für kanzerogene Stoffe aus dem Tabakrauch. (Wittekindt et al. 2012; WHO 2020)

Weitere Risikofaktoren für KHT und somit auch für das CUP<sub>HNSCC</sub> ist zum Beispiel Sonnenexposition der Haut oder EBV-Infektionen. Arbeitsbedingte Holzstaubexposition

ist eine häufige Ursache bei der Entstehung des Plattenepithelkarzinom im Bereich des Nasopharynx, schlechte Mundhygiene bei der des Oropharynx-Plattenepithelkarzinom und Asbeststaubexposition als Risikofaktor für das Larynx-Plattenepithelkarzinom (Wittekindt et al. 2012).

### **1.1.5 Symptome**

Die initiale ärztliche Vorstellung eines Patienten mit <sup>HN</sup>CUP erfolgt häufig aufgrund einer schnell progredienten zervikalen Massenzunahme, bei welcher es sich um vergrößerte Halslymphknoten handelt. Seltener Symptome, welche zur Vorstellung beim HNO-Arzt führen, sind u.a. Halsschmerzen, Globusgefühl, sowie im Verlauf auftretende Dysphagie und B-Symptomatik (Wittekindt et al. 2018). Die zervikalen Lymphknoten erweisen sich nach histopathologischer Diagnostik als Metastase eines Plattenepithelkarzinoms. Der Durchmesser der Lymphknoten reicht bis zu 14cm (Jereczek-Fossa et al. 2004; Erkal et al. 2001). Meist sind die Lymphknoten indolent, nur etwa 10% der Patienten geben Schmerzen in betroffener Region an (Grau et al. 2000).

### **1.1.6 Diagnose**

Die Diagnose CUP ist eine Ausschlussdiagnose, welche erst gestellt werden darf, wenn bei einer histologisch gesicherten Metastase auch nach adäquater Suche kein Primärtumor gefunden wird (Zaun et al. 2018; Jereczek-Fossa et al. 2004). Im Rahmen der initialen onkologischen Diagnostik wird eine Anamnese, eine an der Symptomatik orientierte körperliche Untersuchung, geeignete Bildgebung und eine Biopsie mit entsprechender histopathologischer Gewebeuntersuchung durchgeführt. Wenn dadurch kein Primarius identifiziert werden kann, sollte die Suche intensiviert werden. Hierzu kommen je nach Lokalisation und Arbeitshypothese unter anderem eine spezielle Schnittbildgebung wie z.B. die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), eine Ösophagogastroduodenoskopie und Koloskopie sowie spezielle Blutuntersuchung in Betracht (Krämer und Löffler 2016; Raghav und Varadhachary 2016; Mozet et al. 2013).

Zur Diagnosestellung eines CUP<sub>HNSCC</sub> sollte entsprechend nach der Anamnese die Erhebung des HNO-Status sowie eine zervikale Sonographie zur Detektion metastasensusppekter Läsionen im Halsbereich erfolgen. Bei suspektem Befund kann minimalinvasiv oder mittels Lymphknotenexstirpation Material zur histopathologischen Untersuchung entnommen werden. Beim CUP<sub>HNSCC</sub> sollte im Rahmen der Diagnostik immer eine Panendoskopie der oberen Atem- und Speisewege durchgeführt werden.

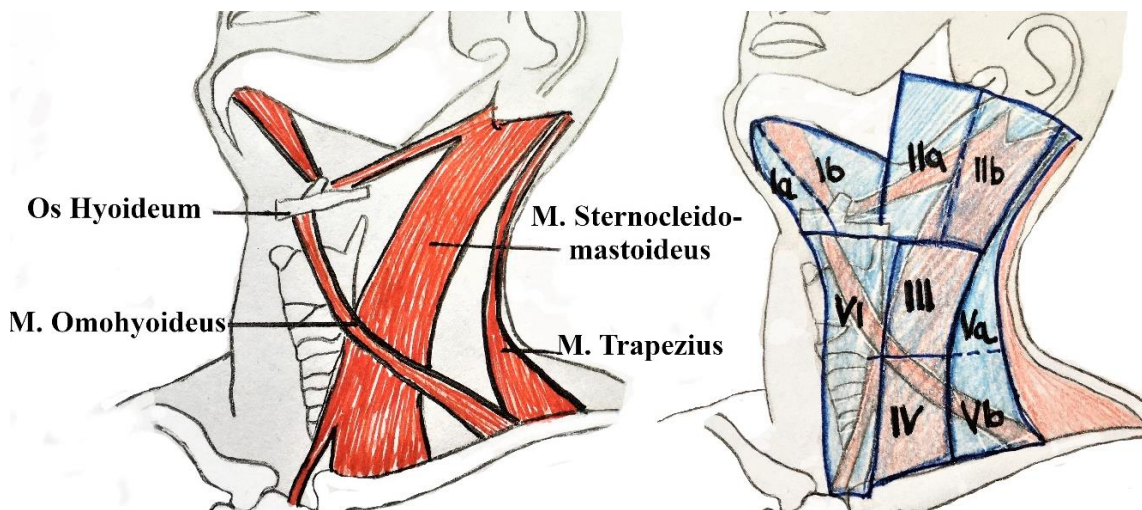
Dabei sollten Proben aus klinisch suspekten Arealen sowie ggf. Proben der Tonsillen und des Zungengrundes entnommen werden, da diese Regionen hochsuspekt für die Lokalisation des Primärtumors sind (Tabelle 1). Zudem sollte ein Primarius der Haut ausgeschlossen werden. Eine PET/CT kann zur Primariussuche erwogen werden (Mozet et al. 2013; Robbins et al. 2002; Zhuang et al. 2014).

Die Tumorausdehnung wird bei Erstdiagnose im sogenannten Staging durch die TNM-Klassifikation erfasst. Das „T“ (*lat. Tumor*) steht für die lokale Ausdehnung des Primärtumors und wird daher bei CUP-Syndrom als „T0“ angegeben, was „kein Primärtumor nachweisbar“ klassifiziert. „N“ (*lat. Nodus*) beschreibt die Metastasierung in regionäre Lymphknoten, welche beim KHT die zervikalen Lymphknoten umfasst (Wittekind und Tannapfel 2006). Beim <sup>HN</sup>CUP gibt das „N“ folgende Information zu der Metastase: N1 bezeichnet eine einzelne Metastase, welche  $\leq 3$ cm ist. N2 wird unterteilt in einzelne Metastase  $>3$ cm und  $<6$ cm (N2a), multiple ipsilaterale Metastasen  $\leq 6$  cm (N2b) und bi-/kontralaterale Metastasen  $\leq 6$ cm (N2c). N3 beschreibt uni- und bilaterale Metastasen  $>6$ cm. „M“ (*altgr. Metastasis*) gibt an, ob eine Fernmetastasierung, also eine Metastasierung abseits der regionären Lymphknoten, vorliegt (M1) (Wittekind et al. 2014).

Die TNM-Klassifikation unterliegt der ständigen Anpassungen an neue Forschungserkenntnisse. In der 2017 überarbeiteten 8. TNM-Klassifikation wurde daher N3 in N3a und N3b unterteilt. N3a beschreibt weiterhin uni- und bilaterale Metastasen  $>6$ cm ohne extranodales Wachstum. N3b beschreibt ipsilaterale Lymphknotenmetastasen  $>3$ cm mit extranodaler Ausbreitung oder jede bi-/kontralaterale Lymphknotenmetastasierung mit extranodaler Ausbreitung. Des Weiteren wurde die Einteilung für p16<sup>INK4a</sup>-positive Lymphknotenmetastasen überarbeitet, sodass für den N-Status nun ausschließlich die Anzahl der Lymphknotenmetastasen ausschlaggebend ist (Wittekind 2017). Aufgrund des Erhebungszeitraums der Proben und des Datenmaterials vor 2017 wird für diese Arbeit die 7. TNM-Klassifikation von 2010 als Grundlage verwendet (Wittekind 2010).

Die genaue Lokalisation der Metastase in die verschiedenen Halsregionen wird in Level angegeben (Abbildung 1). Durch die den Leveln zugeordneten Lymphabflussgebiete lässt sich je nach Lokalisation der Metastase die wahrscheinlichste Lokalisation des Primärtumors ermitteln (Tabelle 1). Zervikal findet sich die Metastase am häufigsten in

Lymphknoten des Levels II (30-50%), in Level I und III finden sich ca. 10-20%, selten betroffen sind Level IV und V mit 5-10%. Meist sind mehrere Lymphknoten befallen (80-90%), jedoch nur in etwa 10 % der Fälle Lymphknoten beider Halsseiten. (Zhuang et al. 2014)



**Abbildung 1: Zervikale Lymphknotenlevel.** Einteilung zervikaler Lymphknoten: links werden die wichtigsten anatomischen Strukturen zur Einteilung der Lymphknotenlevel gezeigt (schematisch, vereinfacht dargestellt); rechts sind die die Lymphknotenlevel I –VI dargestellt. Modifizierte Abbildung nach Som et al. 1999.

**Tabelle 1: Lokalisation zervikaler Metastasen mit wahrscheinlicher Lokalisation des Primärtumors**

Level nach Robbins 1991	Lokalisation der Lymphknoten	Typische Primärlokalisierung des Tumors
I a/b	Submental Submandibular	Mundboden, Unterlippe, Glandula submandibularis
II a/b	Kraniojugulär	Mund- und Nasenhöhle, Naso-/ Oropharynx, Glandula parotis
III	Mediojugulär	Mundhöhle, Oro-/ Nasopharynx, Tonsille, Hypopharynx, Larynx
IV	Kaudojugulär	Hypopharynx, Glandula thyroidea, zervikaler Ösophagus, Larynx
V a/b	Laterales Halsdreieck	Naso- / Oropharynx, Tonsille
VI	Vorderes Halsdreieck	Glandula thyroidea, (Sub-) Glottis, Larynx, zervikaler Ösophagus
	Supraklavikulär	Glandula thyroidea, Ösophagus, Lunge, infradiaphragmal

Erarbeitet und zusammengestellt nach Mozet et al. 2013; Robbins et al. 2002; Zhuang et al. 2014.

In etwa 10-50% aller  $^{HN}CUP$  - Fälle kann innerhalb der ersten zwei Jahre nach Erstdiagnose ein mutmaßlicher Primarius gefunden werden, wobei diese Rate je nach durchgeführter Diagnostik stark schwankt (Pavlidis et al. 2009; Zengel et al. 2012; Cianchetti et al. 2009; Krämer und Löffler 2016). Bis zu 45% dieser Primärtumore wurden in der Fossa tonsillaris detektiert (Cianchetti et al. 2009; Zhuang et al. 2014). Wenn ein Primärtumor gefunden werden kann, ist er meist kleiner als die zuvor als CUP diagnostizierte Metastase. Zengel et al. berichtet von in der ipsilateralen Tonsille gefundenen Primärtumoren mit einer Durchschnittsgröße von 1,1 cm, bei Primarius im Zungengrund von 0,8 cm. Die Größe der Metastase lag durchschnittlich bei 3,1 cm für die Tonsillen- und 2,7 cm für die Zungengrundtumoren (Zengel et al. 2012). Dieser deutliche Größenunterschied erklärt, warum die Metastase zuerst gefunden wird und der Primärtumor in vielen Fällen gar nicht oder nur durch eine forcierte Suche detektiert werden kann. In etwa 20% der Fälle ist selbst bei einer postmortalen Untersuchung kein Primarius zu identifizieren. Abschließend gibt es derzeit keine einheitliche Empfehlung, welche Diagnostik zur Detektion des Primärtumors als Voraussetzung für die Diagnose CUP durchgeführt werden muss. (Krämer und Löffler 2016)

### **1.1.7 Therapie**

Ähnlich wie bei der Diagnostik gibt es derzeit auch keine allgemeingültigen Therapieempfehlungen für Patienten mit  $CUP_{HNSCC}$ . Die bisherigen Empfehlungen basieren alle auf kleineren retrospektiven Studien und auf den Erfahrungswerten der behandelnden Ärzte (Müller von der Grün et al. 2017). Nach einer Studie der University of Pittsburgh mit Patienten von 1980 bis 2011 ist es von Vorteil, wenn der Primärtumor vor Beginn der Therapie gefunden werden kann. Dies ist sowohl in Bezug auf das Gesamtüberleben als auch das krankheitsfreie Überleben mit einer besseren Prognose verbunden. Bei frühem Auffinden des Primärtumors kann mit einer tumorspezifischen Therapie begonnen werden (Davis et al. 2014). Findet sich kein Primärtumor, wird je nach Tumorstadium und individueller Situation des Patienten ein mono- oder multimodales Therapiekonzept evaluiert. Bei  $CUP_{HNSCC}$  in frühen Stadien (N1 bis N2a) und ohne extrakapsulärem Wachstum zeigt sich bislang ein monomodales Therapiekonzept, im Sinne einer vollständigen Resektion, als ausreichend. In einer Metaanalyse konnte bei fortgeschrittenen Stadien (N2b bis N3) die Überlegenheit der multimodalen Therapie aus Operation und Bestrahlung gegenüber monomodalen Therapiekonzepten gezeigt werden (Müller von der Grün et al. 2017). Bei inoperablen

Tumoren sowie Tumoren, welche nicht vollständig entfernt werden können, kann eine neoadjuvante Chemotherapie erwogen werden. In allen anderen Tumorstadien konnte kein eindeutiger Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens durch zusätzliche Chemotherapie zur Operation mit ggf. adjuvanter Strahlentherapie gezeigt werden (Müller von der Grün et al. 2017).

Aufgrund der in Studien belegten häufigen Lokalisation des Primarius im Bereich der Fossa tonsillaris wird die bilaterale Tonsillektomie als diagnostische Option für Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> von einigen Autoren empfohlen (Cianchetti et al. 2009; Zhuang et al. 2014).

## 1.2 HPV

Die Humanen Papillomaviren (HPV) gehören sowohl zu den Risikofaktoren für die Entstehung als auch zu den prognostisch relevanten Faktoren für KHT. Bei HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen kann mit Abstand am häufigsten der Hochrisiko-Typ HPV16 nachgewiesen werden. Die Subgruppe der HPV-positiven Oropharynxkarzinomen ist mit einer guten Prognose für das Gesamtüberleben assoziiert (Wittekindt et al. 2018; Westra 2014).

### 1.2.1 HPV-Klassifikation

HPV gehören zur Familie der Papillomaviridae. Es handelt sich um unbehüllte Viren mit doppelsträngiger, ringförmig geschlossener DNA. Nach Berichten des International Human Papillomavirus Reference Centers konnten bis 2021 227 verschiedene HPV vollständig sequenziert werden (International Human Papillomavirus Reference Center o.J.). HPV werden in fünf Gattungen unterteilt, welche aufgrund ihrer Genomsequenz eindeutig verwandt sind, jedoch sehr unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweisen: Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- und Nu-HPV. Die weitere Unterteilung der Gattung erfolgt in Spezies (Arten) mit biologisch und pathologisch ähnlichen Eigenschaften (Villiers et al. 2004).

Nur die Viren aus den 14 Spezies des Alpha-Genus sind dazu in der Lage, Haut und Schleimhaut zu befallen (Robert Koch-Institut 2018). HPV werden in verschiedene Typen unterteilt, welche per Definition eine maximale Übereinstimmung des Genoms von 90% zu anderen HPV aufweisen dürfen (Villiers 2013). Die HPV werden nach ihrem onkogenen Potential in Hochrisiko- (*high risk*) und Niedrigrisiko- (*low risk*) Typen

unterteilt. Folgende 12 HPV werden von der internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) der WHO als Hochrisikotypen und sicher karzinogen eingestuft: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 (Robert Koch-Institut 2018). Als bekanntestes Beispiel sind HPV 16 und 18 zu nennen, welche für weltweit bis zu 70 % der Zervixkarzinome verantwortlich sind (Buysse und Klug 2017).

Die Niedrigrisikotypen lösen vergleichsweise harmlose Warzen an Händen und Füßen oder im Genitalbereich aus. Insbesondere HPV 6 und 11 werden mit dem Auftreten von Genitalwarzen assoziiert (Robert Koch-Institut 2018; International Human Papillomavirus Reference Center o.J.)

### **1.2.2 Aufbau des HPV**

Die DNA von HPV codiert in der Regel neun *open reading frames* (dt. „offene Leserahmen“). Hierbei werden drei funktionelle Einheiten unterschieden: Zum einen die „early“ (dt. frühe) Region (E), welche die Proteine E1, E2, E3, E4, E5, E6 und E7 kodiert, die für die virale Replikation benötigt werden. Zum anderen die „late“ (dt. späte) Region (L), welche die Strukturproteine L1 und L2 kodiert. Diese sind für den Aufbau der viralen Capside, die Verpackung und den Transfer der HPV-DNA während der Infektion unerlässlich. Zudem gibt es nicht-kodierende Abschnitte, welche als *long control regions* (dt. lange Kontrollregionen) bezeichnet werden. Sie regulieren die Replikation und Transkription (IARC 2007).

Die Proteine E1, E2, E4 und E5 spielen eine wichtige Rolle bei der Replikation und der Transkription der viralen DNA. E1 bindet an spezifische DNA-Elemente im viralen Replikationsursprung und bildet gemeinsam mit E2 einen Komplex. Dieser Komplex kann als ATP-abhängige Helikase die DNA entwinden und somit die Replikation vorbereiten (van Wilson et al. 2002). Es konnte nachgewiesen werden, dass hohe E2-Spiegel die Produktion der mRNA für L1 und L2 induzieren (Johansson et al. 2012).

Dem Protein E4 werden mehrere Funktionen im Zellzyklus des Virus zugeschrieben. Es induziert den Zellzyklus-Arrest in der G2-Phase. Damit wird die Wirtszelle in einem metabolisch aktiven Zustand gehalten und so die effektive Replikation des Virusgenoms gefördert. Außerdem wird E4 beim Aufbau und der Freisetzung des Virus benötigt (IARC 2007; Doorbar 2013).

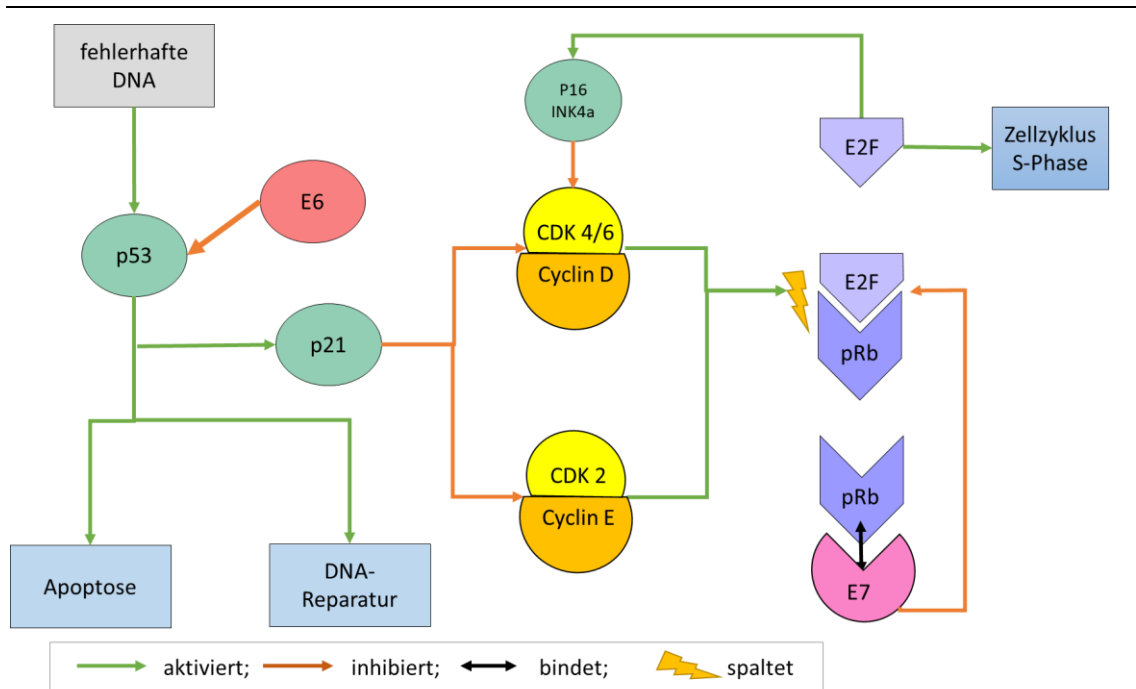
Die Funktion des E5-Proteins ist nicht abschließend geklärt, es steht im Zusammenhang mit der Aktivierung und Verstärkung des Signals von zellulären Wachstumsfaktoren (EGF) und kann durch Interaktion mit Humanem-Leukozyten-Antigen I und II zur Dämpfung des Immunsystems beitragen (Hemmat und Baghi 2018; Wittekindt et al. 2018).

E6 hat die wichtige Eigenschaft, das Tumorsuppressorprotein p53 zu binden und zum Abbau durch das Proteasom zu markieren. Dies verhindert die Apoptose infizierter Zellen (Abbildung 2). E6 greift auch in eine Reihe weiterer Signalwege ein. Zum Beispiel kann E6 mit E6AP einen Komplex bilden, der die Aktivierung von humaner Telomerase reverse Transkriptase bewirkt, welche die Seneszenz der Zelle verhindert. Durch Stabilisation der Telomerlänge ermöglicht die Telomerase eine unbegrenzte Proliferation der Zelle (Gewin et al. 2004). Das E6-Protein ist Angriffspunkt für die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung von HPV-Infektionen (Ricci-López et al. 2019).

Auch das Protein E7 beeinflusst wichtige Signalwege des Zellzyklus durch Bindung an das Retinoblastom-Protein (pRb) (Abbildung 2). Zusammenfassend verhindern E6 und E7 die Apoptose und fördern die Proliferation der epithelialen Zelle, wodurch die HPV-Infektion persistiert (Wittekindt et al. 2018).

L1 ist das Hauptprotein des viralen Kapsids. Unter experimentellen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass L1 Proteine sich eigenständig zu *virus-like-particles* (VLP) zusammensetzen (Kirnbauer et al. 1993). Verbinden sich L1 und L2 zu VLP, so resultiert ein optimierter Aufbau des Viruskapsids. L2 erleichtert zudem die Aufnahme der viralen DNA ins Kapsid (Wang und Roden 2013).

## Einleitung

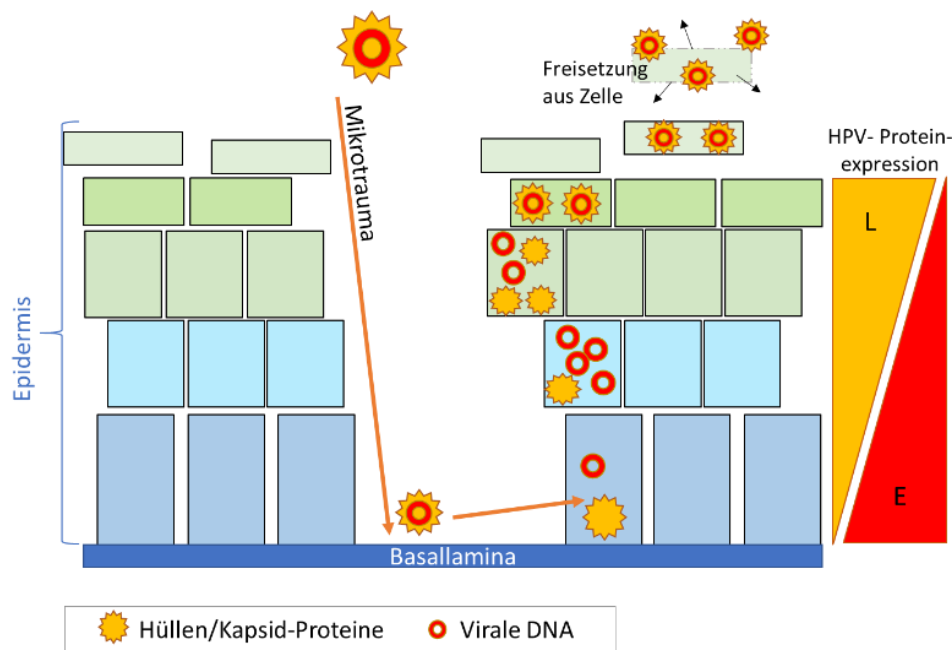


**Abbildung 2: Die Interaktion von E6 und E7 im Zellzyklus.** Vereinfacht dargestellt nach Wittekindt et al. 2018. Wird im Genom fehlerhafte DNA detektiert, so wird über verschiedene Signalwege Tumorsuppressorprotein p53 aktiviert. P53 stoppt den Zellzyklus und kann die Reparatur der DNA oder Apoptose der Zelle einleiten. Außerdem wird durch die Aktivierung von p53 vermehrt p21 freigesetzt, welches die Komplexe aus Cyclin D und CDK4/6 sowie Cyclin E und CDK2 inhibiert. Diese werden für die Freisetzung von E2F aus dem Komplex mit pRb benötigt. E2F lässt die Zelle in die S-Phase eintreten und aktiviert so den Zellzyklus. E6 bindet an das Tumorsuppressorprotein p53, wodurch dieses destabilisiert und proteasomal degradiert wird. Damit werden die Apoptose und die Inhibierung der Zellzyklussynthese verhindert. E7 bindet an pRb und inhibiert somit die Bildung des E2F/pRb-Komplexes, wodurch E2F freigesetzt wird und somit den Zellzyklus in die S-Phase eintreten lässt und diesen aktiviert.

### 1.2.3 Der Replikationszyklus von HPV

Bei Papillomaviren finden alle Phasen des Replikationszyklus in der Epidermis statt (Abbildung 3). Hochrisiko-HPV sind assoziiert mit Schleimhautkarzinomen im Anogenitalbereich wie jenen der Zervix uteri, Vagina, Vulva, Penis und Anus, aber auch mit oralen Malignomen (Kleinsorge und Schmidmayr 2018). Die infizierten Gewebe der Körperregionen haben alle gemeinsam, dass sie aus mehrschichtigem, unverhorntem Plattenepithel aufgebaut sind. In zugänglichen Transformationszonen oder durch Mikrotraumata gelangen infektiöse HPV-Partikel zu den Basalzellen des Plattenepithels. Die Infektion der Basalzellen erfolgt durch Endozytose der Partikel und anschließender Freisetzung der viralen DNA (*uncoting*) innerhalb der Basalzellen. Danach werden

zunächst in den unteren epidermalen Schichten die viralen E-Proteine gebildet. Diese haben regulatorische Wirkung auf Signalwege, deren Aktivierung/Inaktivierung infizierte Zellen vor dem Immunsystem abschirmt und den Zellzyklus antreibt. Durch differenzielle Teilung gelangen die infizierten Tochterzellen in höhere Schichten des Epithels. Dabei nimmt die Konzentration der E-Proteine ab und die Synthese der viralen DNA wird gesteigert. Außerdem nimmt die Synthese der L-Proteine in höheren Schichten zu und virale Partikel werden gebildet. Mit der Abstoßung der obersten Zellschicht der Epidermis und deren Zerfall in der Umwelt erfolgt die Freisetzung der infektiösen HPV-Partikel (Abbildung 3) (Wagner et al. 2018).



**Abbildung 3: Der Replikationszyklus von Humanen Papillomaviren (HPV).** Vereinfacht dargestellt nach Wagner et al. 2018.

## 1.2.4 P16<sup>INK4a</sup>

Die regulatorische Beteiligung von p16<sup>INK4a</sup> im Zellzyklus wurde erstmals 1993 beschrieben (Serrano et al. 1993). Das Tumorsuppressorprotein p16<sup>INK4a</sup> gehört zur Familie der INK4-Proteine. Die Gemeinsamkeit der INK4-Proteine besteht in der Funktion als Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 (Serrano 1997). So übt p16<sup>INK4a</sup> seine Wirkung als Tumorsuppressor über die allosterische Änderung von CDK 4 bzw. 6 aus und erschwert die Bildung eines Komplexes mit Cyclin D (Pavletich 1999). Der Komplex aus CDK4/6 und Cyclin D führt durch Phosphorylierung des Tumorsuppressors Rb zu dessen Deaktivierung und somit zur Freisetzung von zuvor

gebundenem E2F. Hohe E2F-Spiegel in der Zelle bringen diese in die S-Phase und treiben die Proliferation an. Durch eine negative Feedbackschleife wird bei hohen E2F-Konzentrationen der Tumorsuppressor p16<sup>INK4a</sup> vermehrt freigesetzt, was zur Hemmung des Zellzyklus führt (Abbildung 2). (Münger und Howley 2002)

Bei vielen Tumorarten wird die Expression von p16<sup>INK4a</sup> durch Mutation oder Deletion unterdrückt, da es der ungehemmten Proliferation entgegenwirkt, sodass in der Regel keine p16<sup>INK4a</sup>-Expression im Tumorgewebe festgestellt wird. Bei HPV-getriebenen Tumoren wird hingegen eine deutlich vermehrte Expression des p16<sup>INK4a</sup>-Proteins beobachtet. Durch die E7-vermittelte Blockade des pRb/E2F-Signalwegs kommt es zu hohen Konzentrationen von E2F, was wiederum die Expression von p16<sup>INK4a</sup> induziert. Aufgrund der Wirkung von E7 hat p16<sup>INK4a</sup> jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Rb (und somit die Zellproliferation) und wird weiter durch die hohe Konzentration von E2F vermehrt exprimiert (Abbildung 2) (Klaes et al. 2001; Reimers et al. 2007). So erklärt sich die signifikante Korrelation zwischen einer p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression und HPV-DNA in Tumorgeweben. P16<sup>INK4a</sup> ist daher als Surrogatmarker für HPV in der klinischen Praxis etabliert (Klussmann et al. 2003; Westra 2014).

### 1.2.5 HPV-Nachweis

Oropharynxkarzinome, insbesondere Tonsillenkarzinome, sind unter den Tumoren im HNO-Bereich am häufigsten HPV-getrieben (Begum et al. 2005; Wittekindt et al. 2018). Der HPV-Status bei KHT hat sowohl prognostische als auch therapeutische Relevanz. Daher sollte eine routinemäßige Untersuchung aller KHT, insbesondere jedoch der Oropharynxkarzinome, auf HPV durchgeführt werden (Wittekindt et al. 2018; Westra 2014).

Der „direkte“ Nachweis von Humanen Papillomaviren beruht auf dem Nachweis von HPV-DNA oder mRNA im Gewebe. Hierzu sind die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder in-situ-Hybridisation (ISH) etablierte Testverfahren (Prigge et al. 2017). Es besteht außerdem die Möglichkeit die virale Aktivität indirekt mittels IHC nachzuweisen, durch den Surrogatmarker p16<sup>INK4a</sup>. Eine vermehrte Expression von p16<sup>INK4a</sup> kann jedoch auch ohne eine Infektion mit HPV auftreten, weshalb der Nachweis von p16<sup>INK4a</sup> ohne den HPV-Nachweis mittels PCR oder ISH umstritten ist (Prigge et al. 2017; Wittekindt et al. 2018). Andere Autoren postulieren den Nachweis von p16<sup>INK4a</sup> als „ausreichend und sogar überlegene HPV-Nachweismethode“, u.a. da die Expression eindeutig visuell in

den Tumorzellen nachgewiesen werden kann. Ein Nachweis durch Kontamination ist somit praktisch ausgeschlossen. Die Nachweismethode ist zudem bei geringen Kosten und mit vergleichsweise geringem Aufwand durchführbar. (Mollenhauer et al. 2014)

Der Nachweis von HPV durch die PCR ist eine sehr sensitive Methode, da bereits bei Vorhandensein eines einzelnen Zielmoleküls der Nachweis möglich ist. Die Primersets können durch generalisierte Primer (z.B. das „GP5+/GP6+“ Primerpaar) so gewählt werden, dass die gleichzeitige Erfassung verschiedener HPV-Typen möglich ist (Wuerdemann et al. 2019). Allerdings ist durch die hohe Sensitivität die klinische Relevanz dieser HPV-Testmethode umstritten da HPV ubiquitär in der Umwelt vorhanden sind. So kann es z.B. durch Kontamination zu falsch-positiven Testergebnissen kommen. Um das Risiko des falsch-positiven HPV-Nachweises durch Kontamination zu minimieren, sollten die Cut-off-Werte, ab welchen eine Probe als positiv gewertet wird, sorgfältig etabliert sein. Ferner wird diskutiert, den PCR-Nachweis mit dem IHC-Nachweis von p16<sup>INK4a</sup> zu kombinieren, da die IHC den visuellen Nachweis der onkogenen Aktivität von HPV im Tumorgewebe zulässt (Prigge et al. 2017; Mollenhauer et al. 2014).

Zur Bestimmung einer klinisch relevanten HPV-Infektion ist neben dem Nachweis von HPV-Erbgut auch der Nachweis der mit HPV assoziierten onkogenen Aktivität vorausgesetzt. Die biologische Aktivität kann über den Nachweis der Transkription der viralen Proteine E6 und E7 bestimmt werden. Als Goldstandard für onkogene Aktivität gilt daher der Nachweis von viralen mRNA-Transkripten mithilfe der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR). Durch die natürliche Instabilität der mRNA wird bei dieser Nachweismethode zwar eine geringere Sensitivität, jedoch eine hohe Spezifität erreicht. Für jeden Virustyp werden individuell gewählte Primer benötigt, weshalb die Methode technisch aufwendig ist. Die Durchführung ist mit hohen Kosten verbunden und die Zuverlässigkeit der Ergebnisse stark abhängig vom Probenmaterial. Am besten gelingt der Nachweis in Frischgewebe, wohingegen der Nachweis bei fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben nur eingeschränkt möglich ist. Diese Diagnostik ist aufgrund ihrer technischen Voraussetzungen und relativ hohen Kosten nicht an jeder Institution verfügbar und kann ebenfalls zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen (Westra 2014; Prigge et al. 2017; Wuerdemann et al. 2019; Wittekindt et al. 2018). Obwohl nur indirekt, ist der Nachweis der viralen Aktivität anhand der Überexpression von p16<sup>INK4a</sup> aus praktischen Gründen hier überlegen. Der Nachweis von

HPV in Serum oder Plasma durch spezifische HPV-Antikörper ist für die Routinediagnostik nicht ausreichend validiert und somit bisher keine zugelassene Methode (Gross et al. 2020).

In einer Metaanalyse wurden verschiedene Methoden zur Detektion von klinisch relevanten HPV näher untersucht. Als Referenz dient der Nachweis von HPV-mRNA (Goldstandard). Die höchste gepoolte Sensitivität zeigte sich bei der PCR (98%), gefolgt von der IHC (94%). Es folgt die kombinierte Testung von PCR/IHC (93%) und als letztes die ISH (85%). Die höchste gepoolte Spezifität hingegen zeigte sich bei der kombinierten Testung PCR/IHC (96%) gefolgt von der ISH (88%), der PCR (84%) und der IHC (83%) (Prigge et al. 2017).

### **1.3 PD-1/PD-L1**

Im Jahr 1992 beschrieb der japanische Immunologe Tasuku Honjo erstmals den Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) und erhielt 2018 schließlich den Nobelpreis für seine Forschungen zu diesem Protein (NobelPrize.org). Bei PD-L1 handelt es sich um ein glykosyliertes Typ-1-Transmembranprotein, welches auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Es ist auch unter den Namen CD274 oder B7-H1 bekannt. PD-L1 ist für die Modulation des Immunsystems verantwortlich (Acúrcio et al. 2019): Es bindet mit hoher Affinität an den Programmed Death-1 Rezeptor (PD-1 Rezeptor), welcher auf B- und T-Zellen, auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten und auch auf dendritischen Zellen nach der Induktion durch den T-Zell Rezeptor (TCR) und Zytokine exprimiert wird (Wang et al. 2016).

#### **1.3.1 Physiologische Funktion des PD-1/PD-L1-Signalwegs**

Der PD-1/PD-L1-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts von Immunaktivierung und -toleranz. Durch die Bindung von PD-1 mit seinem Liganden PD-L1 werden Signalwege aktiviert, welche zur Abschwächung des Immunsystems führen. So werden überschießende Immunreaktionen verhindert, welche zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen können (Keir et al. 2008; Perri et al. 2020). So konnte eine positive Korrelation einer verminderten PD-L1-Expression und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden, wie beispielsweise bei Lupus arthritis und bei Glomerulonephritiden (Nishimura et al. 1999). Dieser Zusammenhang lässt sich auch im Rahmen der unerwünschten Arzneimittelwirkungen

bei der Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren beobachten (Heinzerling et al. 2019; Keir et al. 2008).

### 1.3.2 PD-1/PD-L1 in Tumorgewebe

Tumore exprimieren tumorspezifische Antigene und können so von Zellen des Immunsystems, z.B. den T-Zellen, entdeckt und bekämpft werden. Fast alle Tumore verfügen daher über Mechanismen, um solche Immunreaktionen zu unterdrücken oder ihrer Wirkung zu entgehen. Einer davon ist die Aktivierung des PD-1/PD-L1-Signalweg. PD-L1 wird von Tumorzellen auf der Oberfläche präsentiert und interagiert mit hoher Affinität mit dem PD-1-Rezeptor auf T-Zellen. Dadurch wird die Aktivierung von T-Zellen unterbunden. Infolgedessen unterbleibt die Signalkaskade zur Proliferation oder Rekrutierung weiterer T-Zellen. Das Immunsystem wird somit nicht aktiviert, der Tumor bleibt unerkannt und wird von der körpereigenen Immunabwehr nicht angegriffen (Abbildung 4) (Keir et al. 2008).

Die prognostische Aussagekraft der Expression von PD-L1 wird bei verschiedenen Tumoren bisher kontrovers diskutiert. In einer Metaanalyse zeigte sich, dass Tumore wie das hepatozelluläre Karzinom, Pankreastumore, Magen- und Ösophagustumore sowie Ovarialtumore bei hoher PD-L1-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Im Gegensatz dazu konnten Studien mit einem Langzeit-Follow-up eine bessere Prognose für Patienten mit erhöhter PD-L1-Expression der Tumore belegen. Beim Plattenepithelkarzinom der Lunge und des Halses ergab sich für die alleinige Expression von PD-L1 bisher keine prognostische Aussagekraft (Wang et al. 2016; Wuerdemann et al. 2020).

### 1.3.3 Weitere Checkpoint-Immunmarker

Neben dem PD-1/PD-L1 Signalweg gibt es weitere inhibitorische Co-Rezeptoren. Dazu gehört u.a. das *Lymphocyte-activation gene 3* (dt. Lymphozyten-Aktivierungs-Gen 3 (LAG 3)). LAG 3 wird auf Tumor-infiltrierenden Leukozyten exprimiert. Es führt über eine Signalkaskade zur Freisetzung von Botenstoffen, welche zu immunsuppressiven Effekten in der Tumormikroumgebung führen und so den Tumor vor dem Immunsystem schützen (*Immunescape*).

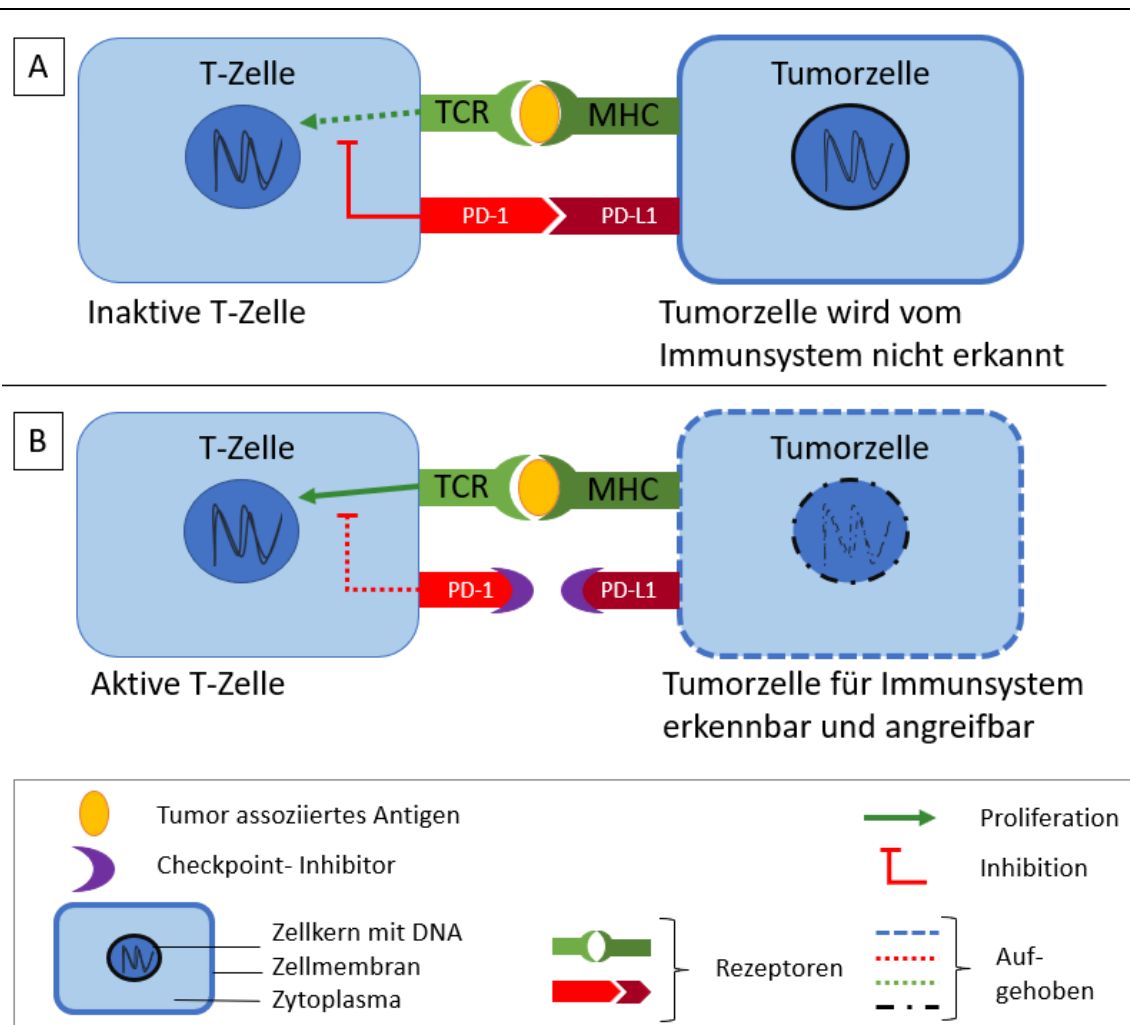
Auch die antigenpräsentierenden Komplexe *major histocompatibility complex I* (MHC; dt. Haupthistokompatibilitätskomplex) und MHC II spielen eine wichtige Rolle in der

Immunpräsentation und Regulation. In Bezug auf humanen Zellen wird äquivalent auch der Begriff „Humanes Leukozytenantigen“ (HLA) verwendet. Infizierte und entartete Zellen produzieren körperfremde Proteine. Diese werden von MHC I auf der Zelloberfläche präsentiert und so von cytotoxischen T-Zellen (CD8+) erkannt. Auf diesem Weg können entartete Zellen vom Immunsystem eliminiert werden. Umgekehrt schützt die Suppression vom MHC I den Tumor vor dem Immunsystem (*Immunescape*). MHC II trägt durch die spezifische Immunantwort zur Elimination von entarteten Körperzellen bei. Über Antigenpräsentation werden T-Helferzellen (CD4+) aktiviert. Diese stimulieren über die Ausschüttung von Zytokinen, u.a. Phagozyten, sowie die Produktion spezifischer Antikörper und führen so zur Elimination der entarteten Zellen.

### **1.3.4 Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren**

Seit einigen Jahren sind die ersten gegen PD-L1 (Avelumab 2017), PD-1 (Nivolumab und Pembrolizumab 2015) und CLA4 (Ipilimumab 2011) gerichteten Checkpoint-Inhibitoren zur Behandlung von Tumorerkrankungen von der europäischen Zulassungsbehörde zugelassen (European Medicines Agency o. J.). Der Wirkmechanismus ist vereinfacht in Abbildung 4B dargestellt. Weitere Studien zur Ausweitung der Zulassung werden aktuell durchgeführt. Im Rahmen der Studie von Harrington et al. 2017 zeigte sich bei Patienten mit KHT ein positiver Effekt auf die Lebensqualität bei Behandlung mit Nivolumab gegenüber der konventionellen Chemotherapie. Schwerwiegende Nebenwirkungen traten unter Nivolumab deutlich seltener auf als bei der konventionellen Therapie. So erfolgte die Empfehlung von Nivolumab im Kopf-Hals-Bereich für Patienten nach Progress unter einer platinbasierten Chemotherapie. Die Kombination von PD-1/PD-L1-Antikörpern mit einer Radio-/Radiochemotherapie bei lokal fortgeschrittenen KHT führt nicht zu gesteigerter Toxizität und ist sicher durchführbar, wobei ein zusätzlicher klinischer Nutzen aktuell erforscht wird. Weitere klinische Studien mit Immuntherapien zur Erstlinientherapie im Kopf-Halsbereich sind initiiert und werden den Stellenwert der Immuntherapie in Zukunft sicherlich steigern. (Kasper et al. 2019)

## Einleitung



**Abbildung 4: Der Signalweg von PD-1/PD-L1 als Beispiel eines Wirkmechanismus von Checkpoint-Inhibitoren.** Vereinfacht dargestellt nach Wu et al. 2019. A: Die Tumorzelle präsentiert über den MHC-Rezeptor ein tumorassoziiertes Antigen. Durch Aktivierung des PD-1/PD-L1-Signalweges kann sie vom Immunsystem (T-Zelle) jedoch nicht angegriffen werden. Die T-Zelle bleibt trotz Erkennens des tumorassoziierten Antigens durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) inaktiv. B: Die Tumorzelle wird vom Immunsystem erkannt und angegriffen. Der PD-1/PD-L1-vermittelte Signalweg wird durch Checkpoint-Inhibitoren ausgeschaltet. Die T-Zelle wird aktiv, das bedeutet sie wird zur Proliferation und Rekrutierung weiterer T-Zellen angeregt und kann die Tumorzelle eliminieren.

## **1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit**

### **1.4.1 Hintergrund und Relevanz der Dissertation**

Beim CUP<sub>HNSCC</sub> kann trotz einer histologisch gesicherten, zervikalen Metastase auch nach umfassender Diagnostik kein Primärtumor gefunden werden. Die Möglichkeiten der histopathologischen und apparativen Diagnostik haben sich in den letzten 20 Jahren wesentlich verbessert, z.B. durch die Möglichkeiten der MRT- und PET/CT-Untersuchungen. Auch die onkologischen Therapiemöglichkeiten haben sich mit der Entdeckung der spezifischen Immuntherapie gewandelt. Es gibt bisher jedoch weiterhin keine allgemeingültigen Empfehlungen bezüglich des diagnostischen Vorgehens oder der Therapie von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> (Müller von der Grün et al. 2017).

Aus der Literatur ist bekannt, dass Patienten mit HPV-getriebenen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich eine günstige Prognose aufweisen. Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> stellen dabei keine Ausnahme dar. Es gilt weitere prognostische Faktoren in den Patientengruppen mit HPV-positivem bzw. negativem CUP<sub>HNSCC</sub> zu erforschen, um Subgruppen zu identifizieren, welche von einer Umstellung der Therapie oder Therapiedeskalation profitieren könnten. Von einer Deeskalation der etablierten Therapiemodalitäten sollte außerhalb klinischer Studien nach aktueller Datenlage Abstand genommen werden.

Durch die quantitative Analyse von PD-L1 in CUP<sub>HNSCC</sub> kann die Relevanz neuer Therapiekonzepte diskutiert werden, wie der Therapie mit PD-1- bzw. PD-L1-Checkpoint-Inhibitoren. Im Vergleich zu langjährig etablierten Therapiekonzepten wie Radio- oder Chemotherapie, zeigten sich diese bislang als besser verträglich und bieten Patienten somit eine bessere Lebensqualität.

### **1.4.2 Fragestellung**

Die vorliegende Arbeit soll zum einen die Rolle von bekannten Risikofaktoren bei Kopf-Hals-Tumoren sowie den Einfluss verschiedenerer Therapiekonzepte bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> retrospektiv analysieren. Zum anderen ist die Arbeit der Frage gewidmet, welche Rolle PD-L1 und HPV bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> spielen und welchen Einfluss diese in Bezug auf das Gesamtüberleben und eine potenzielle Risikostratifizierung haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv: Ein- und Ausschlusskriterien

Für diese Arbeit wurden 104 Patienten identifiziert, welche mit einem CUP<sub>HNSCC</sub> diagnostiziert wurden. Die Diagnose und Behandlung erfolgte im Zeitraum von Januar 2000 bis Dezember 2017 an der Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Gießen. Gewebeproben und weitere Daten der Patienten wurden untersucht und retrospektiv ausgewertet. Die Ausschlussdiagnose „CUP-Syndrom“ wurde angenommen, wenn eine histopathologisch gesicherte Plattenepithelmetastase im Kopf-Hals-Bereich vorlag und der Primärtumor auch nach umfangreicher Diagnostik nicht detektiert wurde. Fälle, bei welchen der Primärtumor später gefunden wurde, wurden aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Die histologische Sicherung der Metastase erfolgte am pathologischen Institut der Universitätsklinik Gießen. Ein weiteres Ausschlusskriterien waren das Fehlen einer schriftlichen Einverständniserklärung seitens des Patienten.

#### 2.1.1 Datenerfassung

Die Erfassung der Patienten des Kollektivs erfolgte mithilfe des Gießener Tumordokumentationssystems (GTDS). Durch eine Abfrage der ICD-10-Diagnosecodes C76-C80 konnten zunächst alle potenziellen CUP-Patienten von 2000 bis 2017 ermittelt werden. Anschließend erfolgte eine sorgfältige Überprüfung der festgelegten Einschluss- und Ausschlusskriterien (s.o.). Die Daten hierfür wurden aus den stationären bzw. ambulanten Patientenakten und dem GTDS ermittelt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die erhobenen Daten und deren Herkunft.

In der Anamnese zeigte sich bei 20 Patienten mindestens ein diagnostizierter Tumor in der Vorgeschichte, wobei ein histologischer Zusammenhang mit dem CUP<sub>HNSCC</sub> von der Pathologie Gießen konkret ausgeschlossen wurde. Bei vier weiteren Patienten wurde zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ein simultanes Zweitkarzinom diagnostiziert, auch hier wurde in allen Fällen ein Bezug zum CUP<sub>HNSCC</sub> histopathologisch ausgeschlossen. Gewebeproben mit enthaltenen Tumorzellen für weitere Untersuchungen wurden, durch die im histopathologischen Gutachten aufgeführten Archivnummern identifiziert (2.2.1).

**Tabelle 2: Datenherkunft des CUP-Kollektivs**

Kategorie		Patientenakte	GTDS
<b>Biometrische Merkmale</b>	Geschlecht	✓	
	Geburtsdatum	✓	
	Body-Mass-Index (BMI)	✓	
	Komorbiditäten	✓	
	Alkoholkonsum	✓	
	Nikotinkonsum	✓	
	ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group)		✓
<b>Laborparameter (bei Erstdiagnose)</b>	Sterbedatum		✓
	Leukozyten	✓	
	Erythrozyten	✓	
	Hämoglobin (HB)	✓	
	Hämatokrit (HK)	✓	
	Thrombozyten	✓	
	Quick	✓	
	INR	✓	
	Partielle Thromboplastinzeit (PTT)	✓	
	Natrium (Na <sup>+</sup> )	✓	
	C-reaktives Protein (CRP)	✓	
<b>Tumorbiometrie</b>	Diagnosedatum	✓	
	Therapiebeginn	✓	
	Operationen	✓	
	Operationsdatum	✓	
	Therapiekonzept	✓	
	histopathologisches Gutachten	✓	
	Staging	✓	
	Tumornachsorge	✓	
	Lokalrezidiv	✓	✓
	Zweitkarzinom	✓	✓
	Fernmetastasen	✓	✓
	Sonstige Ereignisse	✓	✓
	Diagnosecodes		✓

## 2.2 Gewebeproben

### 2.2.1 Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

Für Forschungszwecke zur Verfügung stehende Formalin-fixierte und anschließend in Paraffin eingebettete Gewebe (FFPE-Gewebe) wurden anhand der im histopathologischen Gutachten enthaltenen Archivnummer identifiziert und vom Institut für Pathologie in Gießen bezogen. Die dazugehörigen Hämalaun/Eosin (HE)-gefärbten Übersichtsschnitte waren zu fast allen Blöcken ebenfalls vorhanden. Von 6 Blöcken

wurde aufgrund fehlender HE-Übersichtsfärbungen ein entsprechender Schnitt im HNO-Tumorforschungslabor gefärbt (2.2.2.1).

### **2.2.2 Proben und Gewebeschnitte**

Für die IHC wurden mithilfe eines Schlittenmikrotoms (Leica, Modell SM2010R<sup>®</sup>) von den Paraffinblöcken 2,5µm Schnitte angefertigt und auf Superfrost-Plus-Objektträger aufgezogen, wie in dem SOP „Herstellung Gewebeschnitte“ beschrieben (11.1). Anschließend wurden die Schnitte zum Trocknen 24 Stunden bei 37°C in einem Wärmeschrank gelagert.

Es wurde Probenmaterial angefertigt für den Nachweis von HPV-DNA mittels PCR. Dafür wurden je Probe drei 10µm dicke Schnitte von etwa 1cm<sup>2</sup> großen Gewebeproben (bei größeren oder kleineren Proben entsprechend mehr oder weniger Schnitte) in DNA-LoBind<sup>®</sup>-Tubes der Firma Eppendorf gegeben (11.1). Diese wurden zum Schutz bis zur Verwendung bei 4°C dunkel gelagert.

#### **2.2.2.1 HE-Färbung**

Die HE-Färbung wurde nach einem Standardprotokoll angefertigt (11.2): Zuerst wurden die Schnitte mit Xylol und Ethanol entparaffiniert und rehydriert. Dann wurden sie kurz in vollentsalztes Wasser (VE-H<sub>2</sub>O) getaucht. Als nächstes wurden die Schnitte für 2 min in Hämalaun-Lösung gestellt. Die Bläuerung erfolgte bei 15 min unter fließendem, kaltem Leitungswasser. Anschließend wurden die Objektträger 5 min in die Eosin-Lösung gestellt. Vor dem Dehydrieren wurden die Schnitte für wenige Sekunden in Leitungswasser gehalten und anschließend mit Ethanol und Xylol dehydriert. Als letztes wurden die Schnitte eingedeckelt.

### **2.3 HPV-Nachweis**

Zur Bestimmung des HPV-Status wurde der Nachweis von p16<sup>INK4a</sup> mittels IHC und der HPV-DNA-Nachweis mittels PCR durchgeführt. Für alle p16<sup>INK4a</sup>-positiven und/oder HPV-DNA-positiven Proben des Kollektivs wurden ergänzende Untersuchungen der HPV-mRNA mittels RT-PCR durchgeführt.

### 2.3.1 PCR

Die HPV-Genotypisierung mittels Multiplex-PCR wurde für alle Proben durch das Institut für angewandte Tumorbilogie der Universitätsklinik in Heidelberg im Rahmen einer Zusammenarbeit durchgeführt, wie von Prigge et al. 2015 beschrieben.

### 2.3.2 HPV-mRNA

Die mRNA-Bestimmung gilt als Goldstandard, um eine transkriptionell aktive HPV-Präsenz nachzuweisen (1.2.5). Sie wurde für das Kollektiv für alle Proben durchgeführt, welche entweder HPV-DNA-positiv und/oder p16<sup>INK4a</sup>-positiv getestet wurden. Die Durchführung erfolgte durch Mitarbeiter am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg, wie von Schroeder 2017 und Halec et al. 2013 beschrieben.

### 2.3.3 P16<sup>INK4a</sup>-IHC-Färbung

Die IHC-Färbungen für p16<sup>INK4a</sup> wurden wie die HPV-PCR durch Mitarbeiter des Instituts für angewandte Tumorbilogie in Heidelberg durchgeführt. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden stichprobenartig von 13 Schnitten (12,6%) zusätzlich p16<sup>INK4a</sup>-IHC-Färbungen im HNO-Tumorforschungslabor in Gießen angefertigt, wie beschrieben in Ahling 2017. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Eine positive p16<sup>INK4a</sup>-Färbung lag vor, wenn eine diffuse braun-orangene Färbung des Zytoplasmas und des Zellkerns in mehr als 70% der Tumorzellen sichtbar war.

## 2.4 Biomarker-Expression

### 2.4.1 PD-L1-Färbung

#### 2.4.1.1 Vorversuche

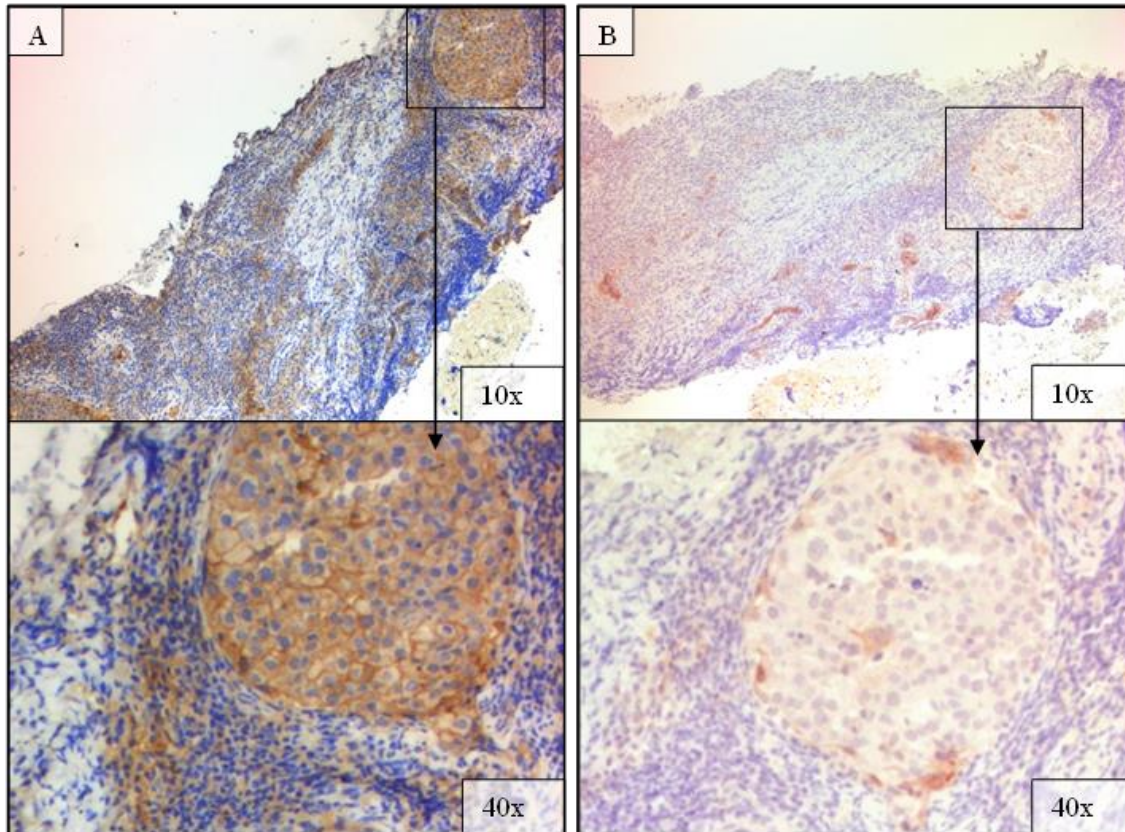
Der Nachweis von PD-L1 erfolgt mittels IHC. Um eine IHC-Färbung mit dem PD-L1-Antikörper von Cell Signaling (Klon E1L3N) zu etablieren, wurden in Vorversuchen verschiedene Protokolle der IHC-Färbung an einem Testkollektiv überprüft. Dieses Testkollektiv bestand aus dem Studienkollektiv (10 Proben) und aus Testgeweben aus der HNO-Tumorforschung (14 Proben). Um eine optimale Färbung zu erreichen, wurden verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers getestet sowie unterschiedliche Entwicklersubstrate zur Anfärbung des Antikörper-Antigen-Komplexes erprobt. Auch die Zusammensetzung der primären Antikörperlösung wurde variiert.

Für die PD-L1-IHC-Färbung wurden für den Antikörper Klon E1L3N das beste Ergebnis nach der folgenden Vorgehensweise erzielt: die Gewebeschnitte wurden zunächst entparaffiniert und dann für 45 min bei 96°C in einer Küvette mit Target-Retrieval-Solution (TRS) pH6 gegeben. Im Anschluss kühlten die Schnitte 30 min bei Raumtemperatur ab und wurden danach für 5 min in einer 1:1 Mischung aus TRS und Tris-buffered saline mit Tween (TBST) gewaschen. Es folgte dreimaliges Waschen mit VE-H<sub>2</sub>O für je 2 min und anschließend das Auftragen der hydrophoben Barriere. Die Schnitte wurden dann 20 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und im Anschluss erneut zweimal 2 min mit VE-H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Schnitte 5 min mit TBST gewaschen. Es folgte für 40 min ein Block mit 2% Bovine Serum Albumin (BSA) in TBST und anschließend das Waschen auf dem Objektträger mit TBS für 1 min. Es wurden je 100µl PD-L1-Antikörper von Cell Signaling 1:100 verdünnt in 0,25% BSA aufgetragen und die Objektträger daraufhin bei 4°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 3 min mit TBS in einer Küvette gewaschen und anschließend je 100µl monoklonaler Hasen-Antikörper Biotin (1:160) in TBS aufgetragen und für 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal 5 min mit TBS gewaschen und je 100µl ABC-Mix aufgetragen und 40 min inkubiert. Es erfolgte das erneute Waschen der Schnitte zweimal 5 min mit TBS. Nun wurden je 100µl NovaRED Peroxidase-Substrat aufgetragen und die Schnitte für 15 min auf dem Rüttler entwickelt. Danach wurden die Schnitte zweimal 5 min mit VE-H<sub>2</sub>O gewaschen und für 2 min in eine mit Hämalaun gefüllte Küvette gegeben. Zuletzt erfolgte das Bläuen für 10 min unter laufendem Leitungswasser, die Dehydrierung der Schnitte und das anschließende Eindeckeln.

Um die Ergebnisse der IHC-Färbung des Testkollektivs mit dem Antikörperklon E1L3N von Cell Signaling zu verifizieren, wurden die Schnitte des Testkollektivs in Zusammenarbeit mit der HNO-Forschung an der Universität zu Köln mit dem PD-L1-Antikörper Dako-Klon 28-8 gefärbt. Die Ergebnisse der IHC sind in Abbildung 5A dargestellt. Da es sich bei PD-L1 um ein Transmembranprotein handelt, wird eine membranständige Färbung bei positiven Proben erwartet.

Bei der Färbung mit dem E1L3N-Klon von Cell Signaling (Abbildung 5B) zeigen sich unspezifische, fleckig gefärbte Areale. Die Färbung ist dabei nicht streng membranständig. Bei der Färbung mit dem Dako-Klon 28-8 zeigt sich eine eindeutig membranständige Färbung. Da auch nach mehreren Vorversuchen keine zuverlässige Färbung von PD-L1 mit dem E1L3N-Klon etabliert werden konnte, wurde entschieden,

die Färbung zur PD-L1-Expression des Kollektivs in Form der Untersuchung mit Tissue Microarrays (TMA)-Schnitten mit dem Dako-Klon 28-8 durch Mitarbeiter an der Universität zu Köln durchzuführen (2.4.2).



**Abbildung 5: Mikroskopische Bilder der PD-L1-Färbungen – Antikörper im Vergleich.**  
A: PD-L1-Färbung mit Dako-28-8-Klon; B: PD-L1-Färbung mit E1L3N-Klon von Cell Signaling.

Es zeigte sich zudem bei den Testfärbungen der Einfluss des Alters der Schnitte auf die Färbeargebnisse. Diese Ergebnisse sind in 3.6.1.1 dargestellt.

### 2.4.2 Tissue Microarrays

Durch die Einbettung mehrerer Gewebeproben in einen Paraffinblock kann die simultane Untersuchung einer großen Anzahl verschiedener Proben auf Biomarker-Expression mittels IHC erfolgen. Aus diesem Grund wurden Gewebszylinder der Tumorblöcke des CUP-Kollektivs zu Tissue Microarrays (TMA)-Blöcken zusammengefügt.

Die Fertigung der TMA-Blöcke erfolgte durch die Mitarbeiter am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Köln in der Abteilung von Prof. Dr. Alexander Quaas (Leiter der Referenzpathologie Tumoren oberer Gastrointestinaltrakt) und wie von Helbig et al.

2016 beschrieben. Kurz zusammengefasst wurden mithilfe eines halbautomatischen Präzisionsinstruments Gewebezylinder mit einem Durchmesser von jeweils 1,2mm aus dem Tumorgewebe der FFPE-Gewebeproben gestanzt und anschließend in Paraffinblöcke mit entsprechen vorbereiteten Löchern eingebettet. Von jedem Tumorblock wurden zwei bis vier Stenzen aus verschiedenen Tumorbereichen entnommen. Voraussetzung für die Erstellung der TMA war ausreichend dickes Gewebematerial auf dem Paraffinblock. Bei 78 CUP-Präparaten (75%) war dies der Fall.

Von den so hergestellten TMA-Blöcken wurden für die weitere Untersuchung mittels IHC-Färbungen wie zuvor beschrieben 4µm dicke Schnitte gefertigt und auf Objektträger aufgezogen (Wuerdemann et al. 2020).

### 2.4.2.1 PD-L1-Antikörper

Die IHC-Färbung der TMA zur Expression von PD-L1 wurde vom Institut für Pathologie der Uniklinik Köln übernommen. Für 81 Metastasen (78%) konnte eine IHC durchgeführt werden. Es wurde der Dako-Klon 28-8 in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Die Durchführung erfolgte wie von Wuerdemann et al. 2020 beschrieben.

Die mit PD-L1-gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines Slide-Scanners (Zeiss Axio Scan.Z1) mit 20x Objektiv vollständig eingescannt und konnten so an einem Computerbildschirm in verschiedenen Vergrößerungen gesichtet und ausgewertet werden. Näheres zu den Ergebnissen in 3.6.1.2.

### 2.4.3 MHC I, MHC II und LAG 3

Es wurden weitere Zellmarker untersucht, welche wie PD-L1 Gegenstand aktueller Forschung bezüglich ihrer Rolle und Funktion auf das Immunsystems sind. Neben PD-L1 wurden ebenfalls IHC-Untersuchungen zu MHC I, MHC II sowie LAG 3 in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Uniklinik Köln, durch Mitarbeiter der Abteilung von Prof. Dr. Alexander Quaas durchgeführt und ausgewertet (Wuerdemann et al. 2020; Arolt et al. 2020).

## 2.5 Statistik

Für die analytischen und statistischen Berechnungen wurden die Programme IBM SPSS Statistics 26 und Microsoft Excel 2016 für Windows verwendet. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% ( $p \leq 0,05$ ) festgelegt. Vom Niveau eines

Trends wird in dieser Arbeit bei einem Signifikanzniveau zwischen 5 und 10% gesprochen ( $p > 0,05$  und  $\leq 0,1$ ).

Unterschiede zwischen Gruppen wurden bei einem Vergleich zweier Merkmale mit dem Chi-Quadrat-Test untersucht, sofern die angegebenen Häufigkeiten in allen Feldern  $\geq 5$  betragen. Falls die angegebenen Häufigkeiten in einem oder mehreren Feldern  $< 5$  betragen, wurde der Exakte Test nach Fischer angewandt.

Der Einfluss einzelner Faktoren auf das Gesamtüberleben der Patienten wurde mithilfe der univariaten Kaplan-Meier-Analyse berechnet. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit geschätzt, wann ein bestimmtes Ereignis (Tod) eintritt. Durch die Kaplan-Meier-Kurve wird die Überlebenszeit graphisch visualisiert: Auf der x-Achse wird die Überlebenszeit aufgetragen und auf der y-Achse die berechnete Überlebenswahrscheinlichkeit. Für die Berechnung des p-Wertes wurde der Log-Rank-Test verwendet. (Zwiener et al. 2011)

Bei der Cox-Regression handelt es sich um ein multivariates Analyseverfahren. Bei der multivariaten Analyse können mehrere Faktoren zusammen daraufhin untersucht werden, wie sie unabhängig voneinander das Überleben beeinflussen. Die Größe des Einflusses der einzelnen Variablen wird durch das Hazard Ratio (HR) angegeben (Zwiener et al. 2011). Es wurden hierdurch unabhängige Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> ermittelt.

Zur Entwicklung der Fallzahlen im zeitlichen Verlauf wurde die einfache lineare Regression berechnet. Für die Korrelation ( $R^2$ ,  $p$ ) wurde der Test nach Pearson angewendet.

### **2.6 Ethik-Votum**

Die Arbeiten zu dieser retrospektiven Studie wurden von der Ethikkommission am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität befürwortend bewertet (AZ 151/11; 296/11).

## 3 Ergebnisse

Für die folgende retrospektive Auswertung zum CUP<sub>HNSCC</sub> wurden 104 Patienten mit Diagnosestellung zwischen Januar 2000 und Dezember 2017 in das Kollektiv eingeschlossen. Das Vorhandensein von HPV-DNA und -mRNA wurde mittels PCR bzw. RT-PCR festgestellt. Mittels IHC wurde der Marker p16<sup>INK4a</sup> untersucht. Zusätzlich erfolgte die Auswertung klinischer Daten nach Sichtung der Patientenakten. Dabei wurden folgende Faktoren erfasst: Tumorstadium, bekannte Risikofaktoren für KHT, durchgeführte Therapie sowie Blutlaborparameter. Des Weiteren wurden Untersuchungen zu den Zellmarkern PD-L1, MHC I, MHC II und LAG 3 durchgeführt.

### 3.1 Klinische Parameter

#### 3.1.1 TNM-Kategorie

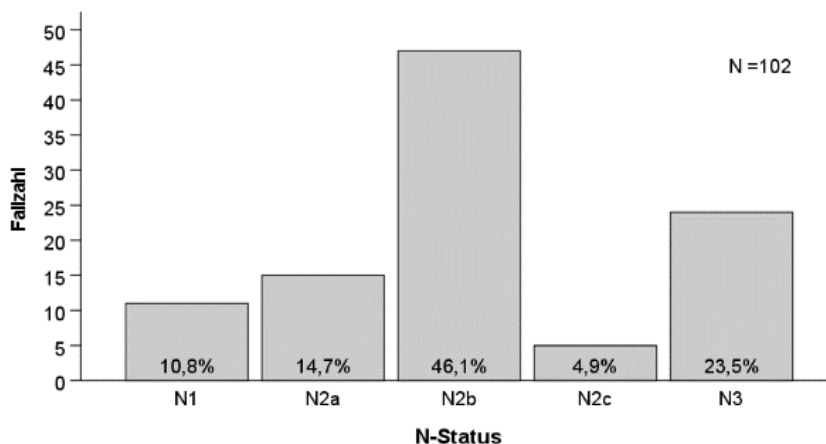
Die TNM-Klassifikation dient zur Einteilung maligner Tumore. Die Größe bzw. Ausdehnung des Primärtumors wird durch das „T“ in der TNM-Klassifikation angegeben. Im Falle des CUP-Syndroms ist der T-Status nicht bekannt (T0). Daher wird diese Tumorgöße durch die Lymphknotenmetastase(n), also durch den N-Status klassifiziert (näheres siehe 1.1.6). Tabelle 3 zeigt die Verteilung des N-Status im Kollektiv. Knapp die Hälfte der Patienten (n = 47; 46,1%) im Kollektiv hatte kleine, multiple, ipsilaterale Lymphknotenmetastasen (N2b). Eine solitäre Lymphknotenmetastase wurde bei insgesamt 27 Patienten (25,5%) diagnostiziert, davon 11 Patienten (10,8%) mit N1 (< 3 cm) und 15 Patienten (14,7%) mit N2a (3 – 6 cm). Bei 29 Patienten (28,4%) wurden multiple, bilaterale oder sehr große ipsi-/bilaterale Lymphknotenmetastasen diagnostiziert. Diese waren bei 6 Patienten (5,8%) bilateral und kleiner als 6 cm (N2c) und bei 24 Patienten (23,5%) ipsi- oder bilateral und größer als 6 cm im Durchmesser (N3). In Abbildung 6 ist die Verteilung des Lymphknotenstatus im Kollektiv visualisiert. Bei zwei Patienten (1,9%) konnte der N-Status anhand der vorliegenden Daten in der Patientenakte nicht näher klassifiziert werden. Daher sind diese Patienten in Tabelle 3 und Abbildung 6 nicht aufgeführt.

## Ergebnisse

**Tabelle 3: N-Status bei CUP-Syndrom**

CUP-Klassifizierung	1 LK	> 1 LK	
		ipsilateral	bilateral
< 3 cm	<b>N1</b> n = 11 (10,8%)	<b>N2b</b> n = 47 (46,1%)	<b>N2c</b> n = 5 (4,9%)
3 – 6 cm	<b>N2a</b> n = 15 (14,7%)		
> 6 cm	<b>N3</b> n = 24 (23,5%)		

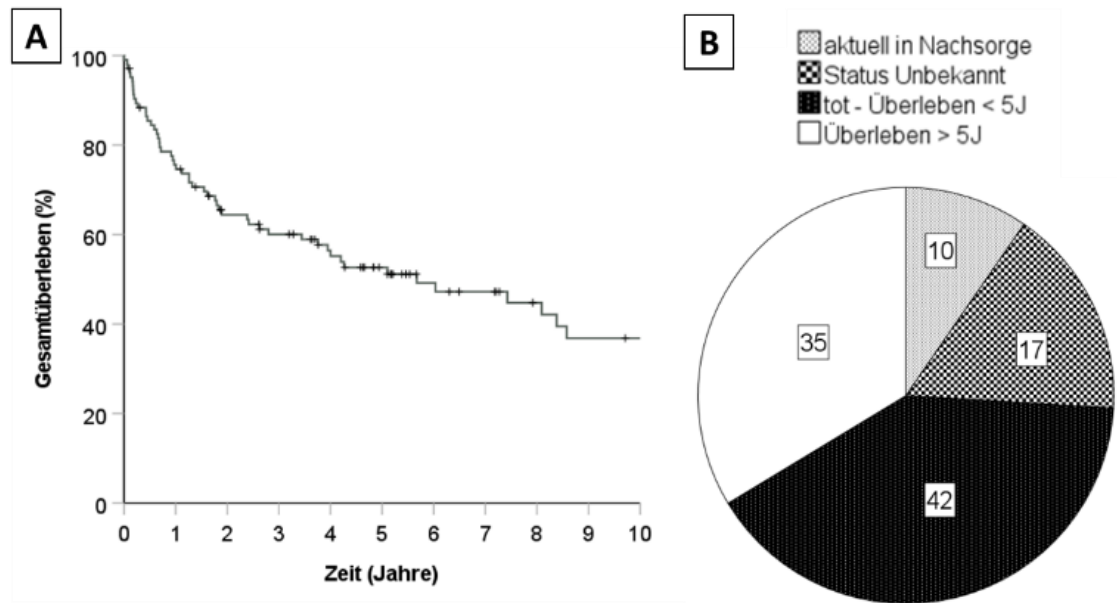
LK = tumorbefallene Lymphknoten



**Abbildung 6: Verteilung des N-Status im Untersuchungskollektiv.** Die Kriterien des N-Status sind in Tabelle 3 aufgeführt.

### 3.1.2 Prognose

In Abbildung 7A ist das Gesamtüberleben für die gesamte Kohorte dargestellt. Die 3-Jahres-Überlebensrate (3-JÜR) beträgt im Kollektiv 62%, die 5 JÜR liegt bei 53%. 10 Patienten (9,4%) befinden sich (Stand 01.01.2019) in regelmäßiger Nachsorge im Universitätsklinikum Gießen. Von 17 Patienten (16,3%) liegen keine vollständigen Angaben über den 5-Jahreszeitraum nach Erstdiagnose vor, da die Tumornachsorge nicht am Universitätsklinikum Gießen durchgeführt oder vorzeitig seitens der Patienten abgebrochen wurde (Abbildung 7B). Dabei ist in 4 der 17 Fälle eine palliative Situation bzw. die Verlegung in ein Hospiz erfolgt.



**Abbildung 7: Gesamtüberleben bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>.** A: Kaplan-Meier-Graf für das gesamte Kollektiv, medianes Gesamtüberleben: 5,7 Jahre, 1-JÜR: 75%, 3-JÜR: 62%, 5-JÜR: 53%; B: Status der Patienten fünf Jahre nach Erstdiagnose.

## 3.2 HPV

### 3.2.1 HPV-Analyse

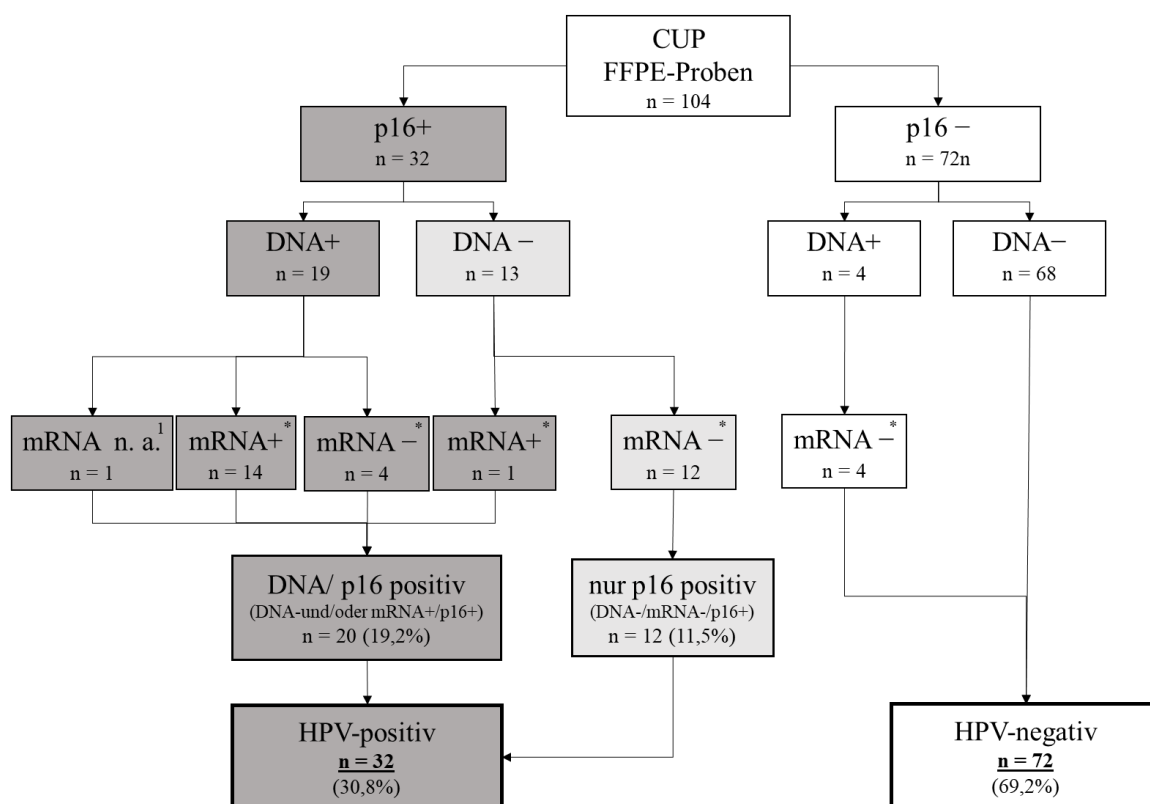
Bei allen Patienten (N = 104) wurde sowohl die p16<sup>INK4a</sup>-IHC als auch die HPV-DNA-Multiplex-PCR mit HPV-Genotypisierung durchgeführt. Zusätzlich erfolgte bei Proben, welche p16<sup>INK4a</sup> und/oder HPV-DNA -positiv getestet wurden, eine Bestimmung der HPV-mRNA (1.2.5).

Von 104 CUP<sub>HNSCC</sub> waren 32 (30,8 %) positiv für p16<sup>INK4a</sup> und 72 negativ. Von den 72 p16<sup>INK4a</sup>-negativen CUP<sub>HNSCC</sub> waren 68 (94,4%) ebenfalls HPV-DNA-negativ. Daher werden diese Fälle als eindeutig HPV-negativ gewertet. Bei vier Fällen konnte trotz p16<sup>INK4a</sup>-Negativität HPV-DNA nachgewiesen werden, jedoch waren diese vier in der Testung auf HPV-mRNA negativ. Da somit kein Hinweis auf transkriptionelle Aktivität von HPV vorliegt und der Verdacht auf Kontamination und somit falsch positive Ergebnisse in der PCR besteht, werden diese Proben ebenfalls den HPV-negativen CUP<sub>HNSCC</sub> zugeordnet (Abbildung 8).

Von den 32 (30,8%) p16<sup>INK4a</sup>-positiven waren 19 (59,4%) DNA-positiv und 13 (40,6%) DNA-negativ. Alle DNA- und p16<sup>INK4a</sup>-positiven Fälle wurden als HPV-positiv gewertet, ungeachtet der mRNA-Ergebnisse. Bei einer p16<sup>INK4a</sup>-positiven Probe konnte

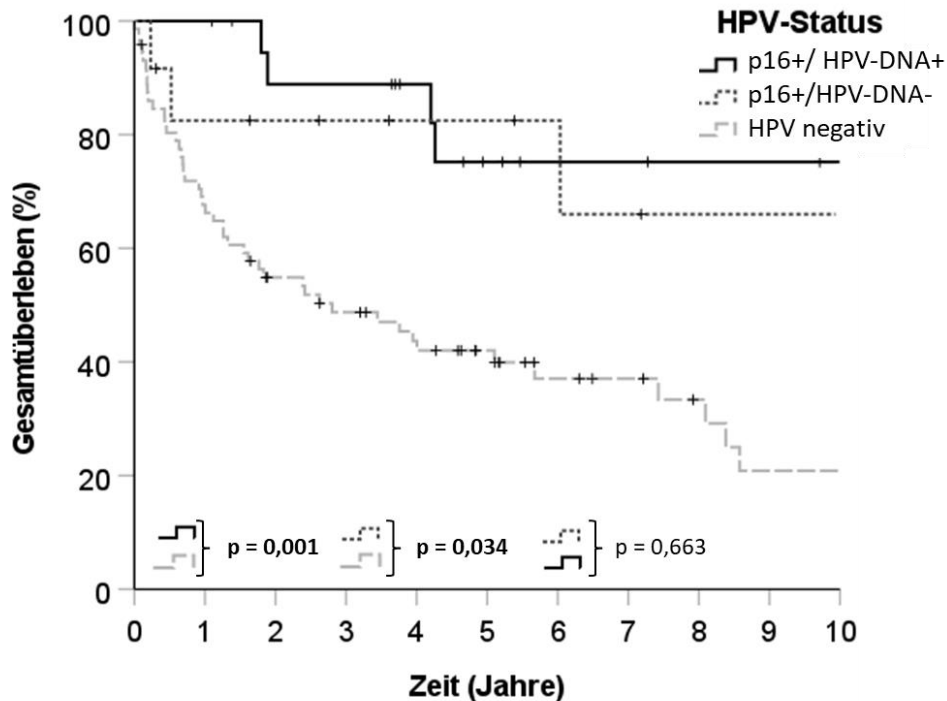
## Ergebnisse

HPV-mRNA jedoch keine DNA nachgewiesen werde, diese wurden ebenfalls als positiv gewertet. Bei 12 Proben (37,5%) war somit p16<sup>INK4a</sup>-Positivität nachzuweisen, jedoch weder HPV-DNA noch HPV mRNA.



**Abbildung 8: Zuordnung des HPV-Status.** \* = mRNA-RT-PCR wurde nur durchgeführt, wenn p16<sup>INK4a</sup> und/oder HPV-DNA im Vorfeld positiv getestet wurden; n. a. = nicht angegeben; <sup>1</sup> = wurde aufgrund von fehlendem Probenmaterial nicht durchgeführt; p16 = p16<sup>INK4a</sup>.

Das Gesamtüberleben der Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> wurde in Abhängigkeit vom HPV-DNA- und p16<sup>INK4a</sup>-Status untersucht. Es zeigt sich, dass das Gesamtüberleben der p16<sup>INK4a</sup>-positiven, HPV-DNA-/mRNA-negativen Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> eher dem der Patienten mit HPV-positivem CUP<sub>HNSCC</sub> entspricht (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> in Abhängigkeit vom HPV-DNA- und p16<sup>INK4a</sup>-Status. Aufteilung in 3 Gruppen: p16<sup>INK4a</sup>+ /HPV-DNA+, p16<sup>INK4a</sup>+ /HPV-DNA- und HPV negativ ( $\hat{=}$  p16<sup>INK4a</sup>-) – vgl. Abbildung 8.

Die Beurteilung des HPV-Status erfolgte nach dem in Abbildung 8 dargestellten Schema. Aus oben genannten Gründen werden p16<sup>INK4a</sup>-positive Proben unabhängig von ihrem HPV-DNA und -mRNA Ergebnis als mutmaßlich HPV-positiv bewertet und zur Vereinfachung in den folgenden Abschnitten der Arbeit als „HPV+“ bezeichnet (sofern nicht abweichend angegeben). Diese Zuteilung wird an späterer Stelle ausführlich diskutiert (4.1).

Für 20 Proben (19 DNA-positive und eine mRNA-positiv) konnte der HPV-Typ bestimmt werden: In 80% (n = 16) dieser Proben wurde der *high-risk*-HPV-Typ 16 nachgewiesen. Bei 15% (n = 3) wurde der *high-risk*-Typ HPV 33 nachgewiesen und in 5% (n = 1) handelte es sich um den *high-risk*-Typ HPV 35.

### 3.2.2 HPV- und p16-Prävalenz bei CUP<sub>HNSCC</sub> in verschiedenen Studien

Tabelle 4 zeigt eine Auswahl verschiedener retrospektiver Studien zur HPV- und p16<sup>INK4a</sup>-Prävalenz bei CUP<sub>HNSCC</sub> welche aus einer Metaanalyse von Boscolo-Rizzo et al. 2015 stammen. Zur besseren Vergleichbarkeit mit unserem Kollektiv wurden Studien extrahiert, welche alle zur HPV-Bestimmung sowohl die p16<sup>INK4a</sup>-IHC als auch die

## Ergebnisse

HPV-DNA-PCR verwendeten. Die HPV- Prävalenz zeigte eine große Spannweite von 15-84% wie auch die p16<sup>INK4a</sup>-Prävalenz (18-84%). Die Kollektive waren mit 13 bis 63 eingeschlossenen Patienten in einem Zeitraum von 5 bis 15 Jahren eher klein. Ausgenommen der Studie von Yasui et al. handelt es sich um Studien aus Europa.

**Tabelle 4: Zusammenfassung von Studien zur HPV-Prävalenz bei CUP<sub>HNSCC</sub>. Modifiziert nach Boscolo-Rizzo et al. 2015**

Referenz	Zeitraum	N	p16 <sup>INK4a+</sup>		HPV+ und p16 <sup>INK4a+</sup>		„echte“ CUP <sub>HNSCC</sub>	Stadt (Land)
			n	%	n	%		
Weiss et al. 2011	2001-2009	13	11	84	11	84	gemischt	Münster (D)
Tribius et al. 2012	2002-2011	63	36	57	23	37	ja	Hamburg (D) Kiel (D)
Zengel et al. 2012	1994-2009	26	21	81	21	81	nein	München (D)
Vent et al. 2013	k.A.	22	4	18	4	18	ja	Köln (D)
Jensen et al. 2014	2000-2011	60	13	21	11	18	ja	Kopenhagen, Herlev (DK)
Sivars et al. 2014	2000-2007	50	21	42	18	36	gemischt	Stockholm (S)
Yasui et al. 2014 <sup>1</sup>	2005-2010	27	14	51	10	37	gemischt	Osaka (JP)
		13	3	23	2	15	ja	
<b>Gesamt</b>		<b>298</b>	<b>129</b>	<b>43</b>	<b>107</b>	<b>36</b>		
Wagner et al. 2023 <sup>2</sup>	2000-2017	104	32	31	20	19	ja	Gießen (D)

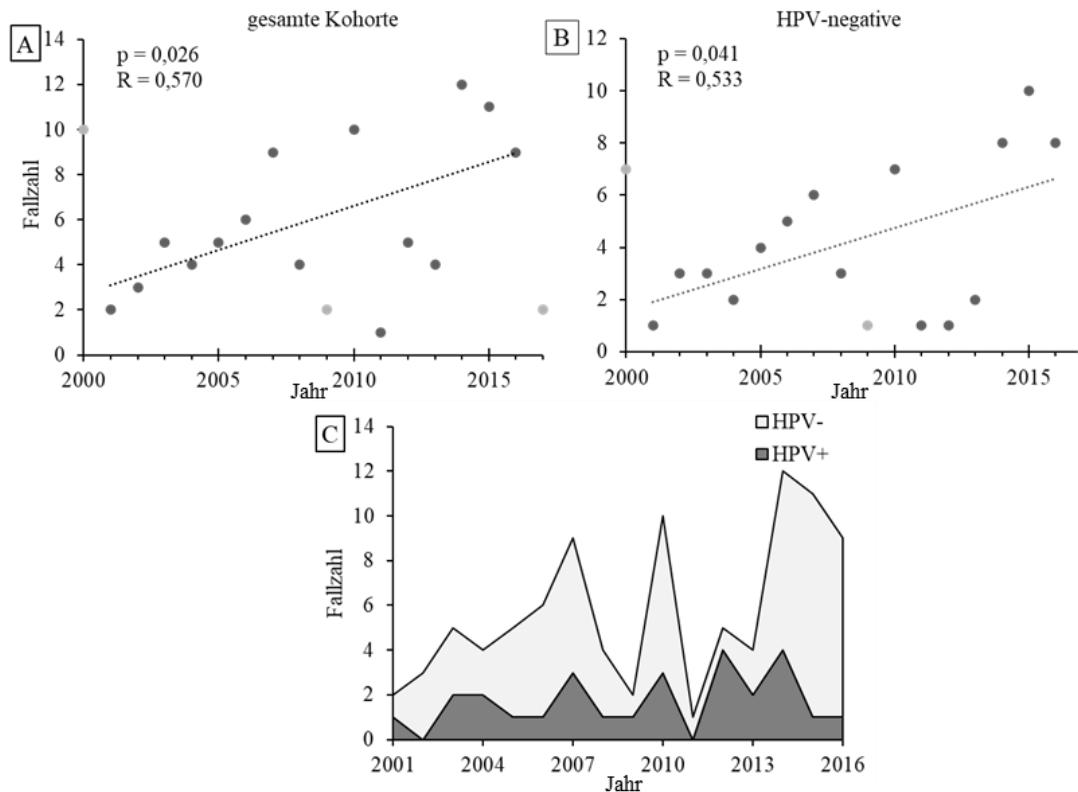
„echte“ CUP<sub>HNSCC</sub> -Fälle: ja = es konnte zu keiner Zeit ein Primarius diagnostiziert werden; nein = Fälle mit initialem CUP-Syndrom zum Zeitpunkt der Diagnose, denen im Verlauf ein Primarius zugeordnet werden konnte, die jedoch nicht rückwirkend aus dem Kollektiv entfernt wurden; 1 = In dieser Studie wurden „echte“ CUP<sub>HNSCC</sub> differenziert betrachtet; 2 = Für die Auswertung des Papers wurde ein Fall aufgrund der Daten nicht einbezogen. D = Deutschland; DK = Dänemark; S = Schweden; JP = Japan; k.A. = keine Angabe.

### 3.2.3 Zeitliche Entwicklung der CUP<sub>HNSCC</sub>-Fallzahlen

Die Fallzahlen in unserem Kollektiv zeigen eine signifikante Zunahme mit einem schwachen bis mäßigen linearen Zusammenhang (R = 0,570) im betrachteten Zeitraum

## Ergebnisse

(Abbildung 10A). Durchschnittlich gab es 5,7 Neuerkrankungen pro Jahr, wobei die Spannweite von 2 bis 12 neuen Fällen pro Jahr reicht. Unter den Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub> stiegen die Fallzahlen im Zeitverlauf signifikant an ( $p = 0,041$ ), während sich bei den allgemein sehr niedrigen jährlichen Fallzahlen der Patienten mit HPV-positivem CUP<sub>HNSCC</sub> (etwa 0 – 4 Patienten pro Jahr) keine signifikanten Veränderungen zeigten. Die Berechnung der linearen Regression erfolgte nach Ausschluss u.g. Datenpunkte.



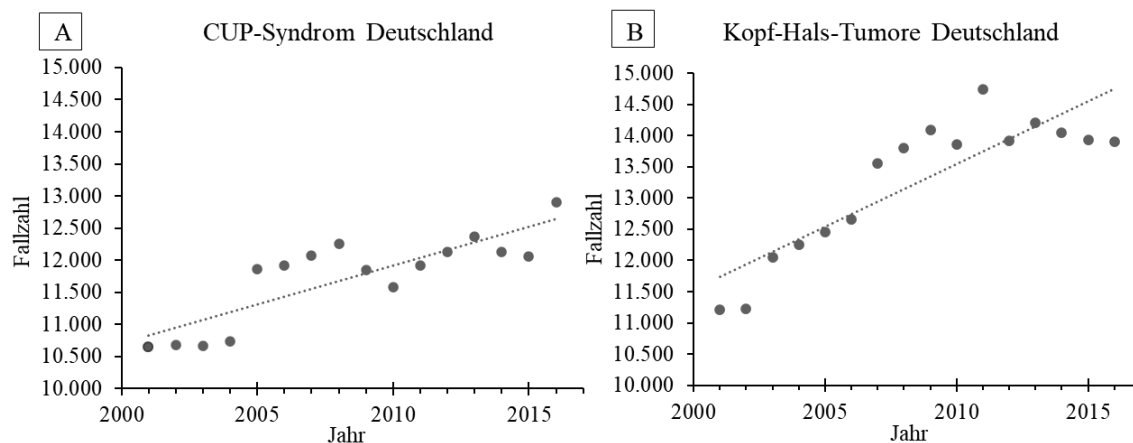
**Abbildung 10: Fallzahlen des CUP<sub>HNSCC</sub> in Gießen.** Fallzahlen aus Gießen von 2000-2017 pro Jahr (A) der gesamten Kohorte bzw. (B) der HPV-negativen Fälle, hellgraue Punkte wurden nicht in die Berechnung einbezogen, näheres siehe Text. C: Gesamtzahl der CUP<sub>HNSCC</sub> aufgeteilt in HPV-positive (dunkelgrau) und HPV-negative Fälle (hellgrau) im Zeitraum von 2001-2016.

Bei einer Untersuchung der zeitlichen Entwicklung der Fallzahlen ist zu beachten, dass gleich große Zeitintervalle betrachtet werden. Dies ist insbesondere für den Datenpunkt des Jahres 2000 relevant: Die Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> wurden durch eine Abfrage der entsprechenden ICD-10-Codes im GTDS identifiziert. Der Detailgrad der Daten lässt jedoch keine Aussage über den Vorstellungsgrund (Erstdiagnose vs. Tumornachsorge) zu. Entsprechend wurde das Jahr 2000 bei der Untersuchung der Entwicklung der

## Ergebnisse

Fallzahlen nicht einbezogen. Darüber hinaus gab es sowohl im Jahr 2009 als auch im Jahr 2017 personelle Umstrukturierungen der HNO-Klinik in Gießen, die zu einer merklichen Reduktion des Patientenaufkommen führten. Um die Entwicklung der Patientenzahlen von diesen bekannten, „intern“ verursachten Schwankungen zu trennen, wurden diese Datenpunkte ebenfalls ausgeschlossen.

Um die Entwicklung unserer lokalen Fallzahlen besser bewerten zu können, wurden die entsprechenden Daten für das Auftreten des CUP-Syndroms in Deutschland aus einer Abfrage der Datenbank des Robert Koch Instituts (RKI) gewonnen. Im Zeitraum von 2001 bis 2016 wird deutschlandweit mit einem starken linearen Zusammenhang ( $R = 0,840$ ) eine signifikante Zunahme der Inzidenz von CUP-Fällen beobachtet (Abbildung 11A). Die Abfrage der Datenbank lässt jedoch keine Zuordnung zu einzelnen Fachgebieten zu. Somit beziehen sich diese Zahlen auf alle diagnostizierten CUP-Fälle jeder Lokalisation und Entität (ICD-10-Diagnosecodes C76-C80). Da das CUP-Syndrom sich i.d.R. ähnlich zu anderen Tumoren gleicher Lokalisation verhält (1.1.3.2), wurden die Fallzahlen für KHT (ICD-10-Diagnosecode C00-C14) ebenso betrachtet: Die Zahl der KHT steigt ebenfalls von 2001 bis 2016 in Deutschland signifikant an, mit einem starken linearen Zusammenhang ( $R = 0,896$ , Abbildung 11B).



**Abbildung 11: Inzidenz für das CUP-Syndrom und KHT in Deutschland.** A: für das CUP-Syndrom – ICD-10-Codes C76-C80; B: Für KHT – ICD-10-Codes C00-C14; A und B: Erstellt nach Rohdaten einer Abfrage der Datenbank des RKIs (ZfKD im Robert Koch-Institut 2020).

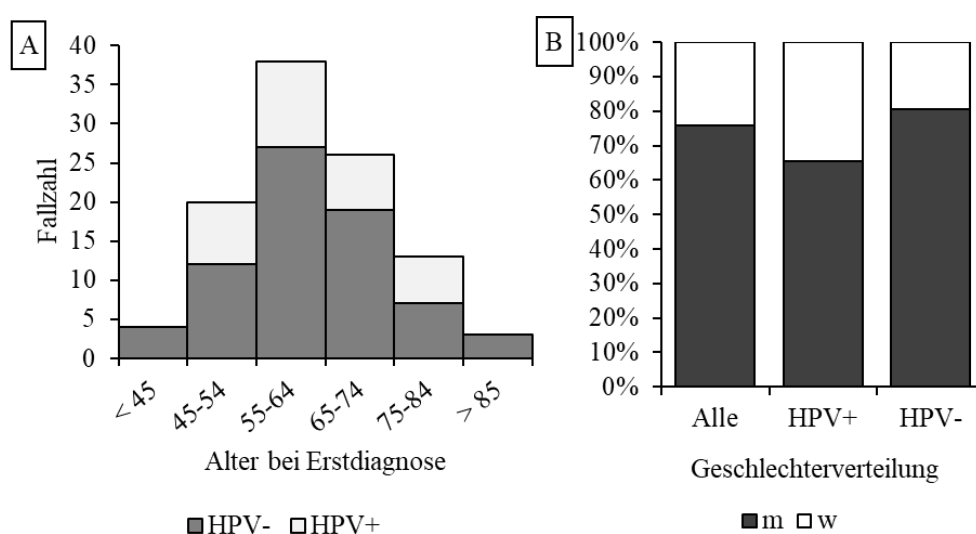
### 3.3 Biometrie und Lebensstil-Risikofaktoren im gesamten Kollektiv und in Bezug zum HPV-Status

Im gesamten Kollektiv wurden folgende biometrische Merkmale und Lebensstil-Risikofaktoren allein sowie auf einen möglichen Zusammenhang mit HPV untersucht: Alter, Geschlecht, ECOG, BMI und Alkohol-/Nikotinkonsum. Diese Einflussfaktoren werden nachfolgend im Detail besprochen.

#### 3.3.1 Alter und Geschlecht

Das Alter bei Diagnosestellung reicht von 32 bis 95 Jahren, das Medianalter liegt bei 62,7 Jahren. Etwa ein Drittel der Patienten war bei Erstdiagnose zwischen 58 und 65 Jahre alt. Nur ca. 10% der Patienten wurden vor dem 46. oder nach dem 82. Lebensjahr diagnostiziert. Die Altersverteilung bei Erstdiagnose ist in Abbildung 12A dargestellt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bei der Altersverteilung zwischen Patienten mit HPV-positivem und -negativem CUP<sub>HNSCC</sub> (Tabelle 7).

Unter den Patienten befinden sich 79 (76,0%) Männer und 25 (24,0%) Frauen. Somit ist ein Verhältnis von Männern zu Frauen mit CUP<sub>HNSCC</sub> -Syndrom von etwa 3:1 gegeben (Abbildung 12B). In der Gruppe der HPV-positiven CUP<sub>HNSCC</sub> ist ein höherer Frauenanteil im Vergleich zur Gruppe der HPV-negativen CUP<sub>HNSCC</sub> zu beobachten (34% vs. 19%). In der statistischen Analyse wird hierbei das Niveau eines Trends mit  $p = 0.100$  knapp erreicht (Tabelle 7).



**Abbildung 12: Alters- und Geschlechterverteilung bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>.**  
A: Altersverteilung bei Erstdiagnose aufgeteilt nach dem HPV-Status,

## Ergebnisse

Durchschnittsalter: 63,4 Jahre, Median: 62,7 Jahre, jüngster Patient: 32,2 Jahre, ältester Patient: 95,2 Jahre, Spannweite 63 Jahre; B: Geschlechterverteilung im Kollektiv stratifiziert nach dem HPV-Status, m = männlich, w = weiblich.

### 3.3.2 ECOG

Der ECOG-Index wird im klinischen Alltag bei Patienten mit Tumorerkrankungen routinemäßig erfasst. Dabei wird die alltägliche körperliche Aktivität (gehen, arbeiten) des Patienten bewertet sowie die Fähigkeit, sich selbst zu versorgen. Die Skala reicht von null bis fünf, wobei null einen uneingeschränkten Patienten, vier hingegen einen völlig pflegebedürftigen Patienten und fünf den Tod klassifiziert (Tabelle 5). Bei über 90% der CUP<sub>HNSCC</sub>-Patienten des Kollektivs war eine Selbstversorgung möglich (ECOG 0-2). Etwa zwei Drittel waren nicht oder nicht wesentlich durch die Tumorerkrankung eingeschränkt (ECOG 0-1).

Patienten mit HPV-positivem CUP<sub>HNSCC</sub> haben im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub> seltener Einschränkungen im Alltag (ECOG 2-4, 19% vs. 38%). In der statistischen Analyse wird dafür das Niveau eines Trends erreicht (Tabelle 5 und dichotomisiert in Tabelle 7).

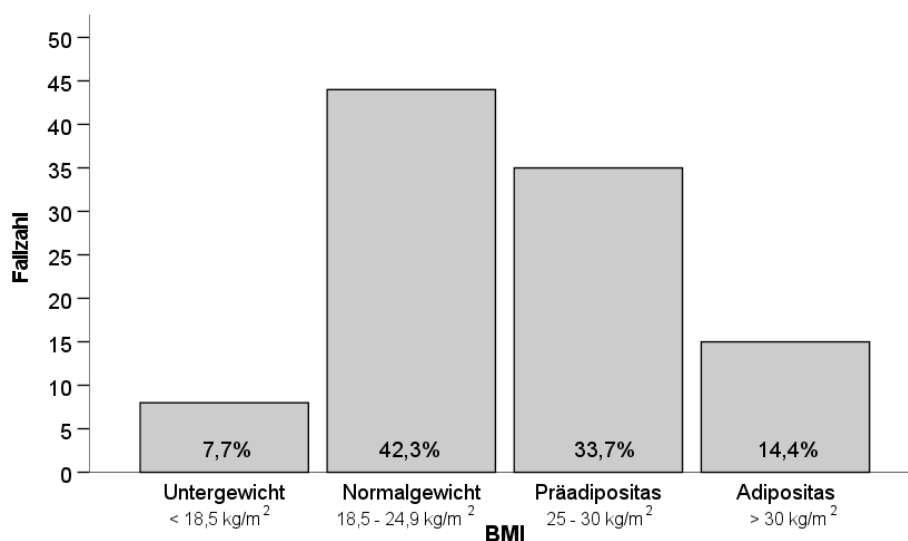
**Tabelle 5: Verteilung des ECOG-Index im Kollektiv nach dem HPV-Status.**

ECOG	Patient kann...	alle		HPV+		HPV-		p
		n	%	n	%	n	%	
0	...uneingeschränkt seine Leistungen wie vor der Krankheit erbringen.	16	15,4	7	21,9	9	12,5	0,395
1	...leichte Arbeit ausführen (Hausarbeit, Büroarbeit).	55	52,9	19	59,4	36	50,0	
2	...sich selbst versorgen, aber nicht arbeiten, jedoch mehr als 50% der Wachzeit aufstehen.	25	24,0	5	15,6	20	27,8	
3	...sich eingeschränkt selbst versorgen und ist mehr als 50% der Wachzeit auf Bett oder Stuhl beschränkt.	7	6,7	1	3,1	6	8,3	
4	...sich nicht selbstversorgen und ist völlig pflegebedürftig (auf Bett /Stuhl beschränkt).	1	1,0	0	0	1	1,4	

ECOG-Index erstellt nach Oken et al. 1982; p = p-Werte berechnet mit dem Exakten Test nach Fischer.

### 3.3.3 BMI

Der *Body Mass Index* (BMI) wird verwendet, um Körpergewicht und Körpergröße in Relation zu bringen. So kann eine erste Einschätzung des Ernährungszustands der Patienten erfolgen. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren unter den 104 Patienten bei zwei Patienten (1,9%) keine Angaben zu Körpergewicht und Größe notiert. Von den verbleibenden 102 Patienten waren 44 Patienten (42,3%) in einem normalen Ernährungszustand (BMI 18,5 kg/m<sup>2</sup>–24,9 kg/m<sup>2</sup>) und 35 (33,7%) in einem leicht übergewichtigen Ernährungszustand (BMI 25 kg/m<sup>2</sup>-30 kg/m<sup>2</sup>). Acht (7,7%) litten an Untergewicht (BMI < 18,5 kg/m<sup>2</sup>) und 15 (14,4%) an Adipositas (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>) (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Verteilung des Ernährungszustands (BMI) bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>.**

Laut einer 2016 veröffentlichten Studie ist insbesondere im Alter ein BMI zwischen 25 kg/m<sup>2</sup> und 30 kg/m<sup>2</sup> unproblematisch und sollte noch als „normal“ gewertet werden (Wojzischke et al. 2016). Demnach liegt bei etwa jedem fünften CUP<sub>HNSCC</sub> Patienten ein problematischer Ernährungszustand vor (BMI < 18,5 kg/m<sup>2</sup> bzw. > 30 kg/m<sup>2</sup>).

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede beim BMI zwischen Patienten mit HPV-positivem und -negativem CUP<sub>HNSCC</sub> (Tabelle 7). Jedoch besteht eine Assoziation zwischen dem BMI und dem ECOG-Status: Bei Patienten mit untergewichtigem Ernährungszustand (BMI < 18,5 kg/m<sup>2</sup>) zeigt sich signifikant häufiger einen pflegebedürftigen Allgemeinzustand (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Zusammenhang von ECOG und BMI.**

	BMI <18,5 kg/m <sup>2</sup>	BMI ≥ 18,5 kg/m <sup>2</sup>	p
ECOG 0-1	2	68	0,011
ECOG 2-4	6	26	

*p = p-Wert berechnet mit dem Exakten Test nach Fischer.*

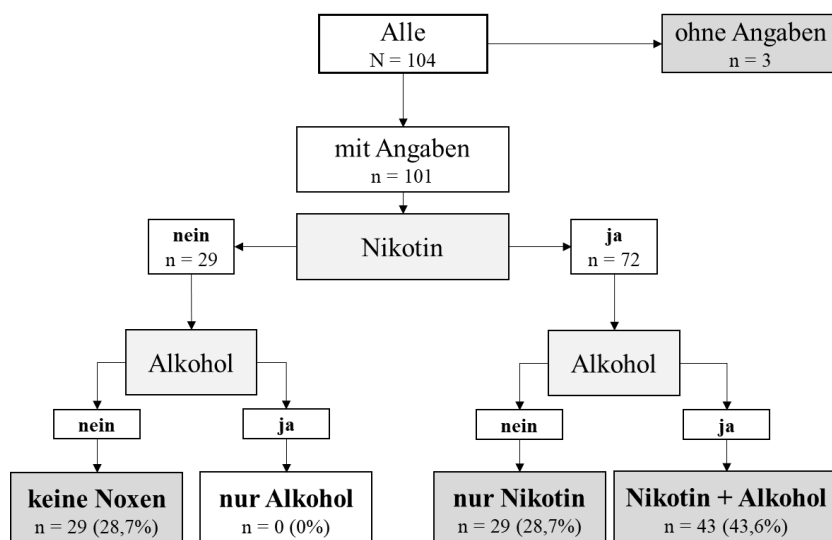
### 3.3.4 Noxen

Insbesondere bei der Entstehung von KHT sind Alkohol- und Nikotinabusus als Risikofaktoren bekannt (Wittekindt et al. 2012). Daher wurde ein besonderes Augenmerk auf diese beiden Faktoren gelegt. Ein signifikanter Nikotinabusus wurde bei mehr als 10 Packyears (PY) definiert (Ang et al. 2010), ein Alkoholabusus bei einem täglichen Alkoholkonsum von mehr als 2 Standardgläsern. Ein signifikanter Nikotin- bzw. Alkoholabusus wird als individueller Risikofaktor bei Patienten gewertet, wenn dieser zum Zeitpunkt der Diagnose oder binnen der letzten 15 Jahre vor der Erstdiagnose bestand.

Unter den 104 CUP<sub>HNSCC</sub> Patienten waren für drei Patienten (2,9%) keine Daten zum Nikotin- oder Alkoholkonsum vorhanden. Unter den verbleibenden 101 Patienten waren 72 (71,3%) aktuelle oder ehemalige Raucher, 29 (28,7%) waren Nichtraucher. 58 Patienten (57,4%) gaben an, keinen oder nur gelegentlich Alkohol zu konsumieren. Ein regelmäßiger Alkoholkonsum lag bei 43 der Patienten (42,6%) vor. Dabei waren 34 Patienten (33,7%) mit fortgeführtem Alkoholabusus bei Diagnosestellung. Neun (8,9%) zeigten keinen aktuellen, jedoch einen Alkoholabusus innerhalb der letzten 15 Jahre vor Erstdiagnose („trockene Alkoholiker“). In Zusammenschau von Nikotin- und Alkoholabusus zeigt sich, dass alle Patienten mit Alkoholabusus (aktuell oder in der Vergangenheit) (n = 43, 100%) auch einen Nikotinabusus (aktuell oder in der Vergangenheit) aufweisen. Die Einteilung in die verschiedenen Gruppen wird in Abbildung 14 visualisiert.

Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub> zeigen signifikant häufiger einen Nikotin- bzw. Alkoholabusus im Vergleich zu Patienten mit HPV-positivem CUP<sub>HNSCC</sub> (Tabelle 7).

## Ergebnisse



**Abbildung 14: Risikofaktoren Rauchen und Alkohol bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>.** Prozentangaben beziehen sich auf alle Patienten mit Angaben zu Nikotin-/Alkoholkonsum.

### 3.3.5 Übersicht der biometrischen Faktoren in Bezug zum HPV-Status

Der Einfluss auf das Gesamtüberleben von Alter, Geschlecht, ECOG, BMI und Alkohol-/Nikotinkonsum wird in Tabelle 7 dichotom mit den entsprechenden Fallzahlen für die gesamte Kohorte und aufgeteilt nach dem HPV-Status zusammengefasst.

**Tabelle 7: Übersicht der Biometrie für das gesamte Kollektiv sowie differenziert nach dem HPV-Status.**

Parameter	Alle (N = 104)		HPV+ (n = 32)		HPV- (n = 72)		p	
	n	%	n	%	n	%		
Alter	<62,7 J	52	50	15	47	37	51	0,671
	>62,7 J	52	50	17	53	35	49	
Geschlecht	m	79	76	21	66	58	81	0,100
	w	25	24	11	34	14	19	
ECOG	0-1	71	68	26	81	45	63	0,058
	2-4	33	32	6	19	27	38	
BMI	≥ 18,5 kg/m <sup>2</sup>	94	92	31	97	63	90	0,430*
	< 18,5 kg/m <sup>2</sup>	8	8	1	3	7	10	
Nikotin	<10PY	29	29	16	52	13	19	0,001
	≥10PY	72	71	15	48	57	81	
Alkohol	nein	58	57	27	87	31	44	< 0,001*
	ja	43	43	4	13	39	56	

J = Jahre; m = männlich; w = weiblich; PY = Packyears p = p-Werte berechnet mit dem  $\chi^2$ -Test (Pearson, asymptotisch, zweiseitig); \* = bei erwarteten Häufigkeiten  $n < 5$  wurde der p-Wert mit dem Exakten Test nach Fischer berechnet.

### 3.4 Tumorcharakteristika, Krankheitsverlauf und Therapie im gesamten Kollektiv und in Bezug zum HPV-Status

Im Kollektiv wurden Tumorcharakteristika, Krankheitsverlauf und die Wahl des Therapiekonzepts auf einen möglichen Zusammenhang mit HPV untersucht. Diese Einflussfaktoren werden in den nachfolgenden Kapiteln im Detail besprochen.

#### 3.4.1 N-Status

Die Verteilung des N-Status insgesamt wurde bereits in 3.1.1 besprochen. Unter Betrachtung des HPV-Status zeigt sich für die Tumorgröße ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit HPV-positivem und -negativem CUP<sub>HNSCC</sub>: Patienten mit HPV-positivem CUP<sub>HNSCC</sub> entwickelten in nur 13% der Fälle große und/oder bilaterale Tumore (N2c-N3). Bei Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub> war dies mit 36% fast dreimal so häufig der Fall (Tabelle 11). Die genaue Aufteilung der Tumorgröße nach dem HPV-Status wird in Tabelle 8 gezeigt.

*Tabelle 8 Verteilung des N-Status nach dem HPV-Status im Kollektiv*

CUP-Klassifizierung	HPV+ (n = 31)			HPV- (n = 71)		
	1 LK	> 1 LK		1 LK	> 1LK	
		ipsilateral	bilateral		ipsilateral	bilateral
< 3 cm	<b>N1</b> n = 2 (6,5%)	<b>N2b</b> n = 18 (58,1%)	<b>N2c</b> n = 1 (3,2%)	<b>N1</b> n = 9 (12,7%)	<b>N2b</b> n = 29 (40,8%)	<b>N2c</b> n = 4 (5,6%)
3 – 6 cm	<b>N2a</b> n = 7 (22,6%)			<b>N2a</b> n = 8 (11,3%)		
> 6 cm	<b>N3</b> n = 3 (9,7%)			<b>N3</b> n = 21 (29,6%)		

*LK = tumorbefallene Lymphknoten*

#### 3.4.2 Krankheitsverlauf

Bei 13 Patienten (12,5%) lag bereits bei Erstdiagnose eine Fernmetastasierung vor. Von den 91 Patienten (87,5%) ohne Fernmetastasen bei Erstdiagnose wurde bei 12 (11,5%) eine Fernmetastasierung während der Tumornachsorge diagnostiziert. 13 Patienten

## Ergebnisse

(12,5%) entwickelten ein Rezidiv, bei 12 (11,5%) wurde ein Zweittumor diagnostiziert. Insgesamt zeigt sich bei 35 Patienten (33,7%) mindestens eines dieser Ereignisse (Rezidiv, Zweittumor, Fernmetastasierung). Patienten mit großem CUP<sub>HNSCC</sub> (N2c-N3) zeigen signifikant häufiger eine Fernmetastasierung oder ein Rezidiv im Vergleich zu Patienten mit kleinerem CUP<sub>HNSCC</sub> (N1-N2a;  $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,005$ ; Tabelle 9).

**Tabelle 9: Zusammenhang von N-Status und Fernmetastasierung bzw. N-Status und Rezidiv.**

		N1.N2b	N2c-N3	p
<b>Fernmetastasierung bei ED</b>	M0	70	19	< 0,001*
	M1	3	10	
<b>Rezidiv</b>	nein	68	21	0,005
	ja	5	8	

ED = Erstdiagnose;  $p = p$ -Werte berechnet mit dem  $\chi^2$ -Test (Pearson, asymptotisch, zweiseitig);  
\* bei erwarteten Häufigkeiten  $n < 5$  wurde der  $p$ -Wert mit dem Exakten Test nach Fischer berechnet.

Patienten mit HPV-positivem CUP<sub>HNSCC</sub> entwickeln dabei seltener einen Zweittumor oder Fernmetastasen im Verlauf als Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub>. In der statistischen Analyse wird jeweils nur das Niveau eines Trends erreicht (Tabelle 11).

### 3.4.3 Therapie

Es gibt für das CUP<sub>HNSCC</sub> keine spezifischen Therapieempfehlungen, die Konzepte orientieren sich daher an denen anderer KHT. Onkologische Therapiekonzepte werden grundsätzlich entsprechend der individuellen Situation des Patienten angepasst.

Tabelle 10 und Abbildung 15 geben einen Überblick über die Fallzahlen und Überschneidungen der durchgeführten Therapien. Bei sieben (6,7%) von 104 Patienten wurde keine Therapie durchgeführt. Die Gründe dafür waren der Patientenwunsch bzw. das Versterben vor Therapiebeginn. Beides war mit einem schlechten Allgemeinzustand bzw. einer infausten Prognose verbunden. Von den 97 Patienten, die therapiert wurden, wurden 19 (19,6%) mit einer monomodalen Therapie behandelt, also nur mit einer der folgenden drei Therapieoptionen: 1. die Operation (Neck-Dissection (ND)), 2. die Radiotherapie und 3. die Chemotherapie. Etwa 80% der Patienten ( $n = 77$ ; 79,4%)

## Ergebnisse

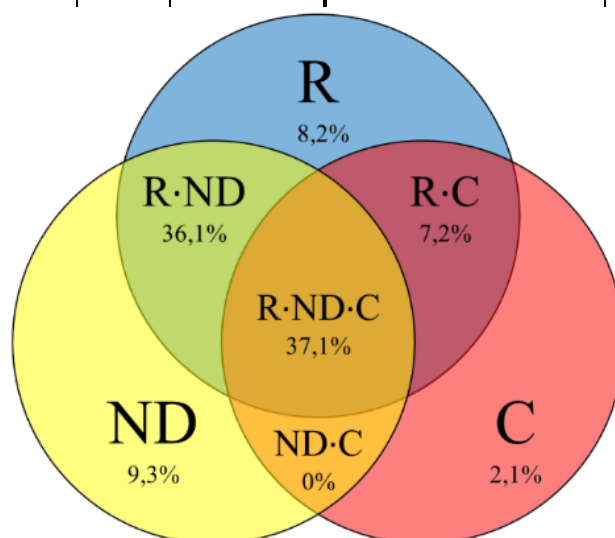
unterzogen sich einem multimodalen Therapiekonzept, das bedeutet, einer Kombination von mindestens zwei der o.g. Therapieoptionen.

Als häufigste Therapieform – ob allein oder in Kombination mit weiteren Therapieoptionen – wurde eine Radiotherapie durchgeführt (n = 88; 90,7%) gefolgt von der Neck-Dissection (n = 80; 82,5%). Insgesamt wurde das CUP<sub>HNSCC</sub> am häufigsten mit einer Kombination aus Neck-Dissection und Radio- bzw. Radiochemotherapie therapiert (n = 71; 73,2%). Bei etwas weniger als der Hälfte der Fälle (n = 47; 48,5%) wurde eine Chemotherapie angewendet.

Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Therapiekonzepte zwischen HPV-positiven und -negativen CUP<sub>HNSCC</sub>-Patienten (Tabelle 11).

**Tabelle 10: Durchgeführte Therapien bei CUP<sub>HNSCC</sub>.**

monomodale-Therapie (n = 19; 19,6%)			multimodale Therapie (n = 77; 79,4%)		
	n	%		n	%
Neck-Dissection (ND)	9	9,3%	ND·R	35	36,1%
Radiotherapie (R)	8	8,2%	ND·C	-	-
Chemotherapie (C)	2	2,1%	R·C	7	7,2%
			ND·R·C	36	37,1%



**Abbildung 15: Angewendete Therapieoptionen beim CUP<sub>HNSCC</sub>.** Die Therapie setzt sich aus bis zu drei Therapieoptionen zusammen, welche miteinander kombiniert werden können. R = Radiotherapie; ND = Neck-Dissection; C = Chemotherapie.

### 3.4.4 Übersicht von Tumorcharakteristika, Therapie und Krankheitsverlauf

In Tabelle 11 sind für Tumorcharakteristika, Therapie und Krankheitsverlauf die entsprechenden Fallzahlen, sowie die Fallzahlen differenziert nach dem HPV-Status aufgeführt.

*Tabelle 11: Übersicht der Tumorcharakteristika, Therapie und Krankheitsverlauf für das gesamte Kollektiv sowie differenziert nach dem HPV-Status*

Parameter		Alle (N = 104)		HPV+ (n = 32)		HPV- (n = 72)		p
		n	%	n	%	n	%	
N-Status	N1-N2b	73	72	27	87	45	64	<b>0,031*</b>
	N2c-N3	29	28	4	13	25	36	
Fernmetastasen bei ED <sup>a</sup>	M0	91	88	30	94	61	85	0,335*
	M1	13	13	2	6	11	15	
Fernmetastasen im Verlauf <sup>b</sup>	M0	79	87	28	93	51	84	0,324*
	M+	12	13	2	7	10	16	
Rezidiv	nein	91	88	30	94	61	85	0,335*
	ja	13	13	2	6	11	15	
Zweitumor <sup>c</sup>	nein	92	88	31	97	61	85	0,099*
	ja	12	12	1	3	11	15	
Neck-Dissection	nein	24	23	6	19	18	25	0,485
	ja	80	77	26	81	54	75	
Radiotherapie	nein	16	15	3	9	13	18	0,257*
	ja	88	85	29	91	59	82	
Chemotherapie	nein	57	55	17	53	40	56	0,818
	ja	47	45	15	47	32	44	
keine Therapie	nein	97	93	31	97	66	92	0,433*
	ja	7	7	1	3	6	8	
Therapiekonzept	mono	26	25	6	19	20	28	0,326
	mult.	78	75	26	81	52	72	

*n. a.: nicht angegeben; <sup>a</sup> = Fernmetastasierung nur bei Erstdiagnose; <sup>b</sup> = Fernmetastasierung im späteren Verlauf, dafür wurden nur Patienten mit M0 bei Erstdiagnose betrachtet; <sup>c</sup> = Auftreten einer zweiten Tumorerkrankung, welche nicht im Zusammenhang mit der Erstdiagnose steht; mono = monomodales Therapiekonzept; mult = multimodales Therapiekonzept; p = p-Werte berechnet mit dem  $\chi^2$ -Test (Pearson, asymptotisch, zweiseitig); \* bei erwarteten Häufigkeiten  $n < 5$  wurde der p-Wert mit dem Exakten Test nach Fischer berechnet.*

### 3.5 Routine Laborparameter im gesamten Kollektiv und in Bezug zum HPV-Status

Eine Blutanalyse ist Teil jeder Tumordiagnostik. Routinemäßig werden Blutbild, Elektrolyte und die Gerinnung untersucht. Die Normwerte bei den Laborparameter können je nach Methoden und Möglichkeiten des Labors variieren. Daher wurden zur Bewertung und Interpretation der Laborwerte der angegebene Referenzbereich des Labors der Universitätsklinik Gießen angewandt (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Verteilung der Laborwerte von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>. Nach Referenzbereich des Labors der Universitätsklinik Gießen (Stand 23.03.2020).**

Laborparameter	Normwert	Einheit	Im Kollektiv		
			- %	Norm %	+ %
Leukozyten	3,9 - 10,2	10 <sup>9</sup> /l	2	64	35
Hämoglobin	m: 13,5 -17,2 w: 12,0 – 15,4	mg/l	27	72	1
Erythrozyten	m: 4,3 – 5,75 w: 3,9 – 5,15	10 <sup>12</sup> /l	23	76	1
Hämatokrit	m: 0,395 - 0,505 w: 0,355 - 0,45	l/l	23	75	2
Thrombozyten	150 -370	10 <sup>9</sup> /l	4	64	32
TPZ (Quick) <sup>c</sup>	70-130	Quick (%)	0	99	1
INR <sup>c</sup>	0,8 -1,2	Int. Ratio	0	100	0
PTT <sup>c</sup>	26-36	Sekunden	3	92	5
Natrium	135-145	mmol/l	12	79	9
CRP	< 10	mg/l	-	44	18 <sup>a</sup>   38 <sup>b</sup>

*norm = Normalwert; -/+ = erniedrigt/erhöht (vgl. Referenzbereich); <sup>a</sup> = leichte Erhöhung des CRPs > 5 < 10 mg/l; <sup>b</sup> = starke Erhöhung des CRPs > 10 mg/l; <sup>c</sup> = wurden i.d.R. erst bei Aufnahme zu geplantem Eingriff (Operation) abgenommen; m = männlich; w = weiblich; l = Liter; mmol = Millimol.*

Insgesamt zeigen sich besonders häufig die Inflammationsparameter CRP (66%) und Leukozyten (34%) als pathologisch verändert, ebenso Hämatokrit, Hämoglobin und Erythrozyten. Für die Gerinnungsparameter TZP, INR und PTT zeigen sich nur wenige

## Ergebnisse

Abweichungen vom Normalbereich. Die Verteilung der Laborwerte im Kollektiv ist in Tabelle 12 aufgeführt.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede für die Verteilung der Laborparameter zwischen HPV-positiven und negativen Patienten (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Übersicht der Laborparameter im Rahmen der Tumorroutinediagnostik für das gesamte Kollektiv sowie differenziert nach dem HPV-Status.**

Parameter		Alle (N = 104)		HPV+ (n = 32)		HPV- (n = 72)		p
		N	%	N	%	N	%	
<b>Leukozyten</b>	norm	65	64	23	74	42	59	0,146
	-/+	37	36	8	26	29	41	
<b>CRP</b>	norm	43	44	16	55	27	39	0,144
	+	55	56	13	45	42	61	
<b>HKT</b>	norm	77	75	26	84	51	72	0,194
	-/+	25	25	5	16	20	28	
<b>HB</b>	norm	74	73	25	81	49	69	0,226
	-/+	28	27	6	19	22	31	
<b>Natrium</b>	norm	80	79	24	80	56	79	0,899
	-/+	21	21	6	20	15	21	

*norm = normal; -/+ = erniedrigt/erhöht; HKT = Hämatokrit; HB = Hämoglobin p = p-Werte berechnet mit dem  $\chi^2$ -Test (Pearson, asymptotisch, zweiseitig).*

Es zeigt sich eine Assoziation von CRP und der Tumorgröße. Patienten mit großen Tumoren (N2c–N3) zeigen signifikant häufiger erhöhte CRP-Werte im Vergleich zu Patienten mit kleinen Tumoren (N1–N2b) ( $p = 0,004$ ).

**Tabelle 14: Zusammenhang von CRP und N-Status**

	CRP normal*	CRP pathologisch*	p
<b>N1 – N2b</b>	37	34	0,004
<b>N2c – N3</b>	5	21	

*\* = Referenzwerte für CRP sind in Tabelle 12 aufgeführt. p = p-Wert berechnet mit dem  $\chi^2$ -Test (Pearson, asymptotisch, zweiseitig).*

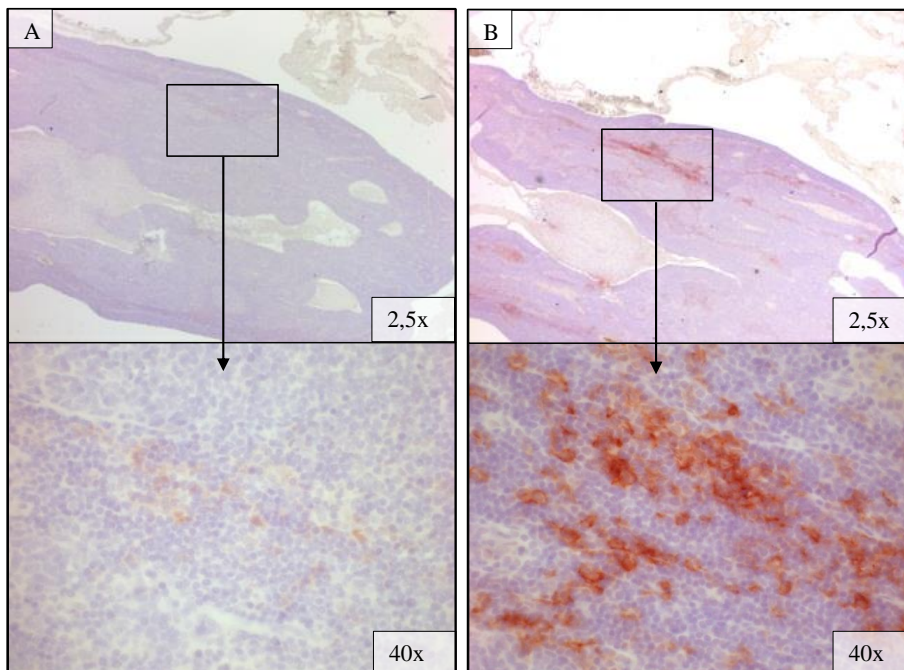
## 3.6 Zelluläre Biomarker im gesamten Kollektiv und in Bezug zum HPV-Status

Im Kollektiv wurden die histologischen Merkmale PD-L1, MHC I, MHC II und LAG 3 auf einen möglichen Zusammenhang mit HPV untersucht. Diese Einflussfaktoren werden nun im Detail besprochen.

### 3.6.1 PD-L1

#### 3.6.1.1 PD-L1-Färbung im Vergleich

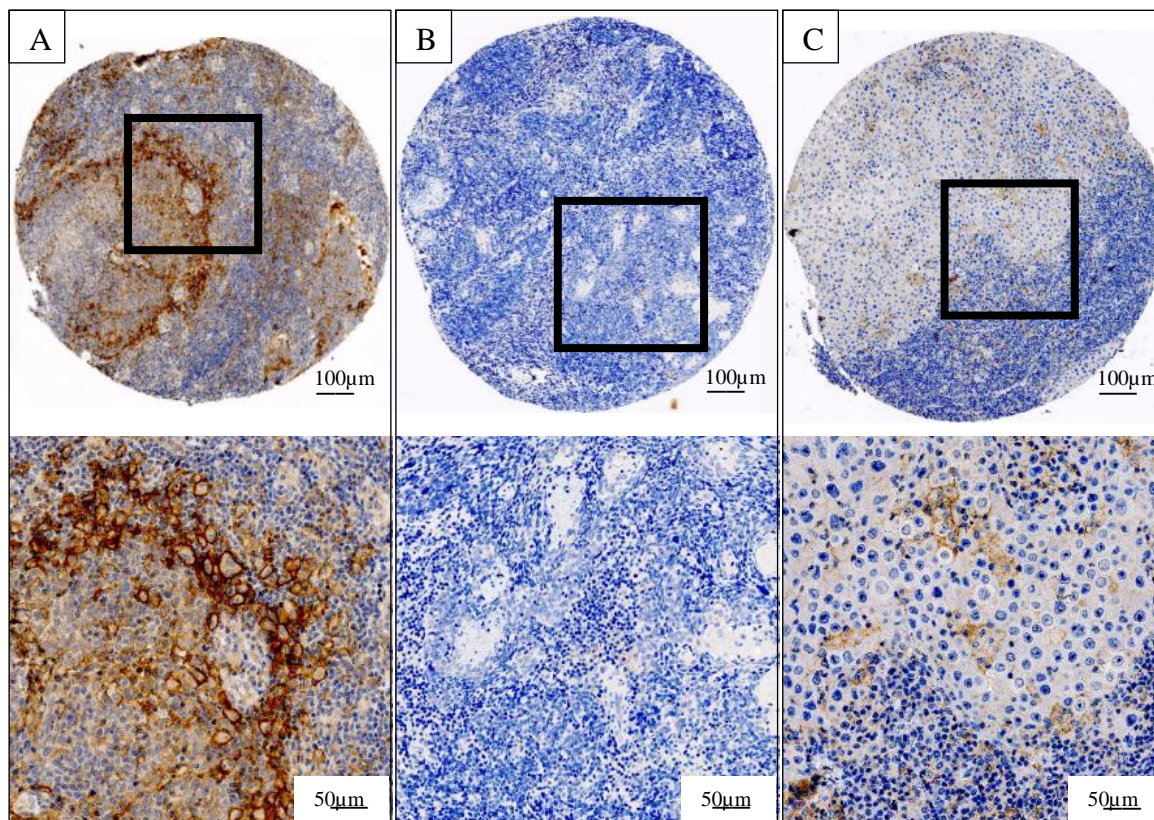
Wie bereits in 2.4.1 beschrieben, erfolgten Probefärbungen an einem Testkollektiv. Bei Testfärbungen mit anti-PD-L1 Antikörper (E1L3N, Cell Signaling) zeigen sich trotz Verwendung des gleichen Färbeprotokolls deutliche Unterschiede. Bei frischen Schnitten, welche maximal 4 Wochen vorher angefertigt wurden, kann eine starke, jedoch teilweise unspezifische Färbung beobachtet werden. Ältere Schnitte zeigen an der gleichen Stelle keine oder nur eine sehr schwache Färbung. Das Färbeergebnis unter Verwendung des Antikörperklons E1L3N von Cell Signaling zeigt sich damit als stark abhängig vom Alter der Schnitte (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Einfluss des Alters der Schnitte auf die PD-L1-IHC mit E1L3N-Antikörperklon. Färbung mit PD-L1-Antikörperklon E1L3N von Cell Signaling in jeweils aufgenommen mit 2,5x und 40x Objektiv A: fünf Jahre vor IHC-Färbung geschnitten und bei 4°C dunkel gelagert; B: vor der IHC-Färbung neu geschnitten (max. 4 Wochen alt).

## Ergebnisse

Da keine zuverlässige Färbung von PD-L1 mit dem E1L3N-Klon etabliert werden konnte, wurde die IHC mit dem Dako-Klon 28-8 durchgeführt (2.4.1). Es wird eine membranständige Färbung bei PD-L1-positiven Proben erwartet. In Abbildung 17 sind exemplarisch die IHC-Ergebnisse für PD-L1 dargestellt.



**Abbildung 17: Mikroskopische Bilder der IHC mit PD-L1-Dako-Antikörper.** Im oberen Abschnitt jedes Bildes (A-C) ist die vollständige TMA-Stanze abgebildet, im unteren Bildabschnitt jeweils eine Vergrößerung des rechteckig gekennzeichneten Bereichs. A zeigt exemplarisch eine positive, membranständige Färbung im Tumorrandbereich. In B ist exemplarisch ein negatives Färberegebnis dargestellt. C zeigt exemplarisch eine positive, membranständige Färbung, welche nicht im Tumorrandbereich lokalisiert ist.

### 3.6.1.2 PD-L1 im gesamten Kollektiv

Entsprechend dem Vorgehen nach Wuerdemann et al. 2020 werden Proben mit membranständiger Färbung bei  $\geq 1\%$  der Tumorzellen als positiv gewertet. Es zeigt sich bei 31 der 81 auswertbaren CUP<sub>HNSCC</sub> (38,3%) eine positive PD-L1-Färbung. Hierbei zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit HPV-positivem und HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub> (Tabelle 15).

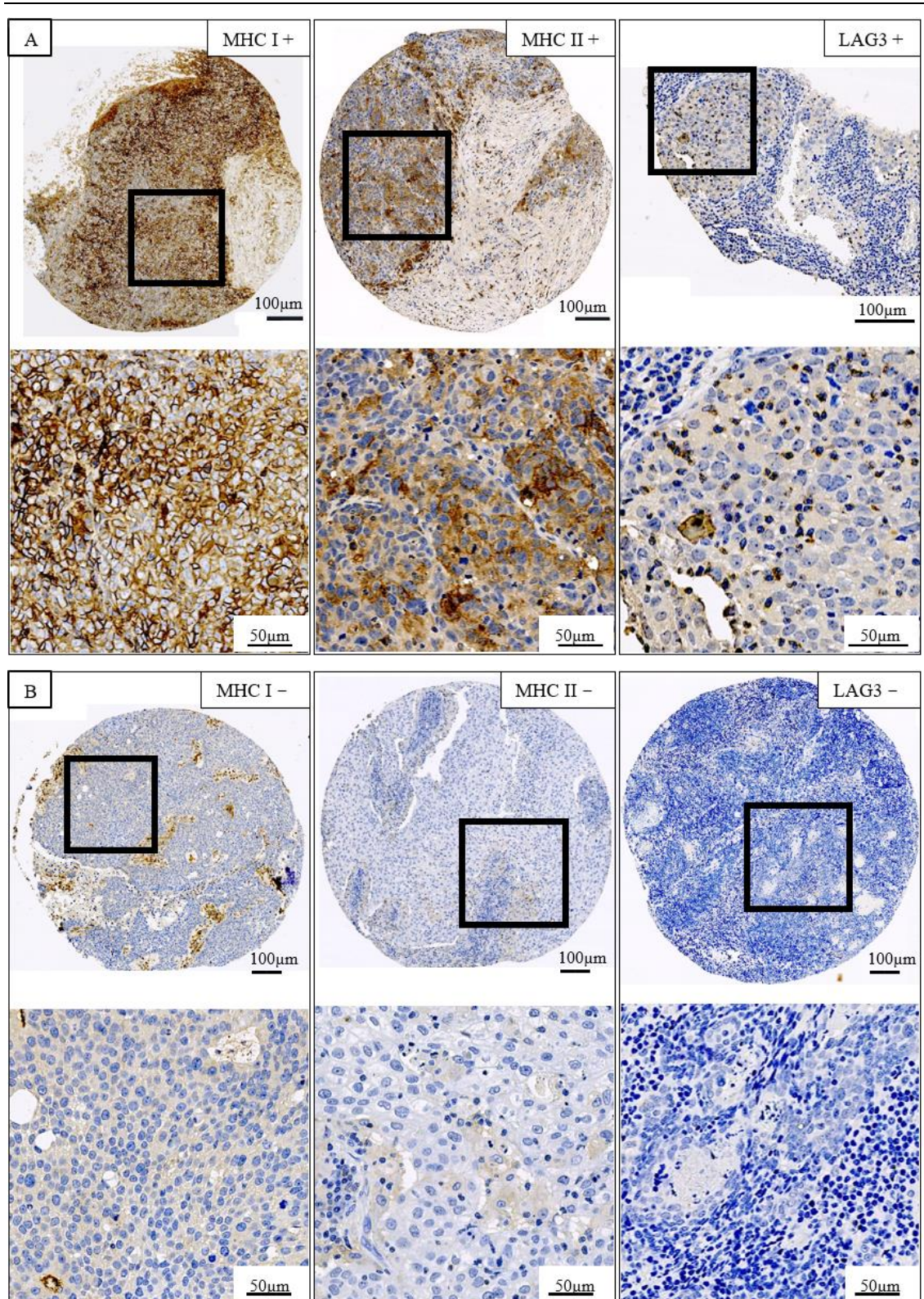
In einer weiteren Auswertung wird die Interaktion von PD-L1 mit Immunzellen stärker berücksichtigt und Proben werden als positiv gewertet, wenn in der PD-L1-IHC eine membranständige Färbung des Tumorrands und/oder der Immunzellen im Randbereich des Tumors zu sehen ist (Abbildung 17). Diese Auswertung ist angelehnt an den „*Combined positive score*“ (CPS, dt. kombinierte positive Wertung), der PD-L1-positive Tumor- und Immunzellen in Relation zur Gesamttumormasse bringt ( $((\text{PD-L1+Zellen/sichtbare Tumorzellen}) * 100)$ ). Der CPS wird bislang vor allem beim Urothelkarzinom angewendet und soll Patienten mit gutem Therapieansprechen identifizieren (Schildhaus 2018). Bei 29 CUP<sub>HNSCC</sub> wird eine positive Färbung des Tumorrands und/oder der Immunzellen des Tumorrands beobachtet. HPV-positive CUP<sub>HNSCC</sub> zeigen bei dieser Auswertung häufiger Positivität im Vergleich zu HPV-negativen CUP<sub>HNSCC</sub>, jedoch erreicht dieser Unterschied lediglich das Niveau eines Trends (Tabelle 15).

### **3.6.2 MHC I, MHC II, LAG 3**

Für die weiteren zellulären Marker MHC I, MHC II und LAG sind die Ergebnisse der IHC exemplarisch in Abbildung 18 dargestellt.

Im Kollektiv sind 26 (33%) der 79 Proben für MHC I negativ (<20% positive Tumorzellen), 52 (67%) zeigen eine positive MHC I Färbung (>20% positive Tumorzellen). Für MHC II sind 63 (81%) negativ (<1% positive Tumorzellen), 7 (9%) zeigen eine schwach-positive Färbung (1-25% positive Tumorzellen) und 8 (10%) eine stark-positive Färbung (>25% positive Tumorzellen). Bei LAG 3 zeigt sich bei 28 der 79 (36%) Proben ein negatives Ergebnis (<1% tumorinfiltrierenden Lymphozyten gefärbt), 22 (28%) sind schwach-positiv (1-5% der TIL positiv) und 28 (36%) stark-positiv (> 5% der TIL positiv) in der IHC.

## Ergebnisse



**Abbildung 18: Mikroskopische Bilder der IHC zum Nachweis von MHC I, MHC II und LAG 3. Im oberen Abschnitt jedes Bildes ist die vollständige TMA-Stanze abgebildet, im unteren Bildabschnitt jeweils eine Vergrößerung des rechteckig gekennzeichneten Bereichs. A: Jeweils beispielhafte Darstellung eines positiven Ergebnisses; B: Jeweils beispielhafte Darstellung eines negativen Ergebnisses.**

### 3.6.3 Übersicht der zellulären Biomarker

Es zeigen sich für MHC I, MHC II und LAG 3 keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit HPV-positivem und -negativem CUP<sub>HNSCC</sub> (für Tabelle 15 dichotom zusammengefasst).

*Tabelle 15: Übersicht der zellulären Biomarker für das gesamte Kollektiv sowie differenziert nach dem HPV-Status.*

Parameter		Alle (N = 104)		HPV+ (n = 32)		HPV- (n = 72)		p
		N	%	N	%	N	%	
PD-L1 ≥1% der Tumorzellen	negativ	50	62	15	52	35	67	0,167
	positiv	31	38	14	48	17	33	
PD-L1 im Randbereich	negativ	52	64	15	52	37	71	0,080
	positiv	29	36	14	48	15	29	
MHC I	negativ	26	33	10	37	16	31	0,614
	positiv	52	67	17	63	35	69	
LAG 3 <sup>1</sup>	negativ	50	64	15	56	35	69	0,252
	positiv	28	36	12	44	16	31	
MHC I /LAG 3	negativ	19	24	6	22	13	25	0,749
	positiv	59	76	21	78	38	75	
MHC II <sup>1</sup>	negativ	63	81	23	85	40	78	0,558*
	positiv	15	19	4	15	11	22	

1: Variablen wurden dichotom zusammengefasst, für die genaue Verteilung siehe 3.6.2.  $p = p$ -Werte berechnet mit dem  $\chi^2$ -Test (Pearson, asymptotisch, zweiseitig); \* bei erwarteten Häufigkeiten unter  $n < 5$  wurde der  $p$ -Wert mit dem Exakten Test nach Fischer berechnet.

### 3.7 Tumorcharakteristika von CUP<sub>HNSCC</sub> im Vergleich zu oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen

Aufgrund der Ähnlichkeiten des CUP-Syndroms zu Primärtumoren entsprechender Lokalisation (1.1.3.2) führten wir einen Vergleich von Risikofaktoren und zellulären Markern der CUP<sub>HNSCC</sub> und oropharyngealen Plattenepithelkarzinome (OPSCC) aus Gießen durch. Die Kohorte der OPSCC-Patienten aus Gießen wurde durch unsere Arbeitsgruppe bereits in mehreren Veröffentlichungen näher charakterisiert (Wittekindt et al. 2019; Wagner et al. 2020; Wuerdemann et al. 2020). Für beide Entitäten werden im Zeitraum von 2000-2017 folgende Faktoren verglichen: HPV- und p16<sup>INK4a</sup>-Status, Nikotin- und Alkoholabusus, Alter, ECOG, Geschlecht sowie die Zellmarker PD-L1, MHC I und LAG 3 (Tabelle 16).

## Ergebnisse

Der Anteil der Patienten mit Nikotin- und Alkoholabusus ist im OPSCC-Kollektiv etwa 10% höher als im CUP<sub>HNSCC</sub> -Kollektiv. LAG 3-Positivität wird bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> signifikant häufiger festgestellt. Bei Diagnose sind die CUP<sub>HNSCC</sub> -Patienten im Durchschnitt etwa 2,4 Jahre älter als die OPSCC-Patienten. Insgesamt zeigen sich ansonsten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Auch die zellulären Biomarker HPV und PD-L1 zeigen ähnliche Verteilungen in beiden Tumorentitäten.

**Tabelle 16: Vergleich CUP<sub>HNSCC</sub> vs. OPSCC aus Gießen**

Risikofaktoren		Alle		OPSCC		CUP		P
		N = 792	%	n = 688	%	n = 104	%	
<b>Nikotin</b>	nie	151	20%	122	18%	29	29%	0,066
	früher / Raucher	618	80%	546	82%	72	71%	
<b>Alkohol</b>	nein/ gelegentlich	342	48%	285	47%	58	57%	<b>0,043</b>
	(trockener) Alkoholiker	371	52%	327	53%	43	43%	
<b>Alter</b>	in Jahren (Median)	61,3		61,1		62,7		
<b>Geschlecht</b>	männlich	612	77%	533	77%	79	76%	0,732
	weiblich	180	23%	155	23%	25	24%	
<b>ECOG</b>	gesund (0-1)	556	71%	485	71%	71	68%	0,552
	krank (2-4)	230	29%	197	29%	33	32%	
<b>Zellmarker</b>								
<b>PD-L1</b>	negativ	153	65%	92	59%	50	62%	0,724
	positiv	83	35%	63	41%	31	38%	
<b>MHC I</b>	negativ	75	34%	49	34%	26	33%	0,889
	positiv	146	66%	94	66%	52	67%	
<b>LAG 3</b>	negativ	126	54%	98	78%	50	47%	<b>&lt; 0,001</b>
	positiv	107	46%	28	22%	57	53%	
<b>HPV<sup>1</sup></b>	negativ	588	74%	504	73%	84	81%	0,102
	positiv	204	26%	184	27%	20	19%	
<b>p16<sup>INK4a</sup></b>	negativ	537	68%	465	68%	72	69%	0,822
	positiv	255	32%	223	32%	32	31%	

<sup>1</sup> Positiv = HPV-DNA und p16<sup>INK4a</sup>-positiv getestet, negativ = HPV-DNA und/oder p16<sup>INK4a</sup>-negativ getestet; p-Werte berechnet mit dem x2-Test (Pearson, asymptotisch, zweiseitig).

### 3.8 Prognostisch relevante Faktoren mit Einfluss auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>

Für die Berechnung des Gesamtüberlebens wird im folgenden Kapitel die univariate Analyse nach Kaplan-Meier verwendet und in entsprechenden Kaplan-Meier-Grafen visualisiert.

#### 3.8.1 Überlebenszeit in Abhängigkeit vom HPV-Status

Es besteht ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit HPV-positivem CUP<sub>HNSCC</sub> im Vergleich zu Patienten mit negativem HPV- CUP<sub>HNSCC</sub> (Abbildung 19). Das mediane Überleben beträgt für Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub> etwa 2,8 Jahre. Für Patienten mit HPV-positivem CUP<sub>HNSCC</sub> kann das mediane Überleben aufgrund der niedrigen Sterberaten nicht berechnet werden. Für Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub> liegt das mittlere Überleben bei 5,3 Jahren, für HPV-positive bei 10,4 Jahren. Die 5-Jahre-Überlebensrate beträgt 44% bei den HPV-negativen Fällen, bei den HPV-positiven liegt sie bei 77%. Tabelle 17 gibt einen Überblick über die Überlebenszeit und die Überlebensrate.

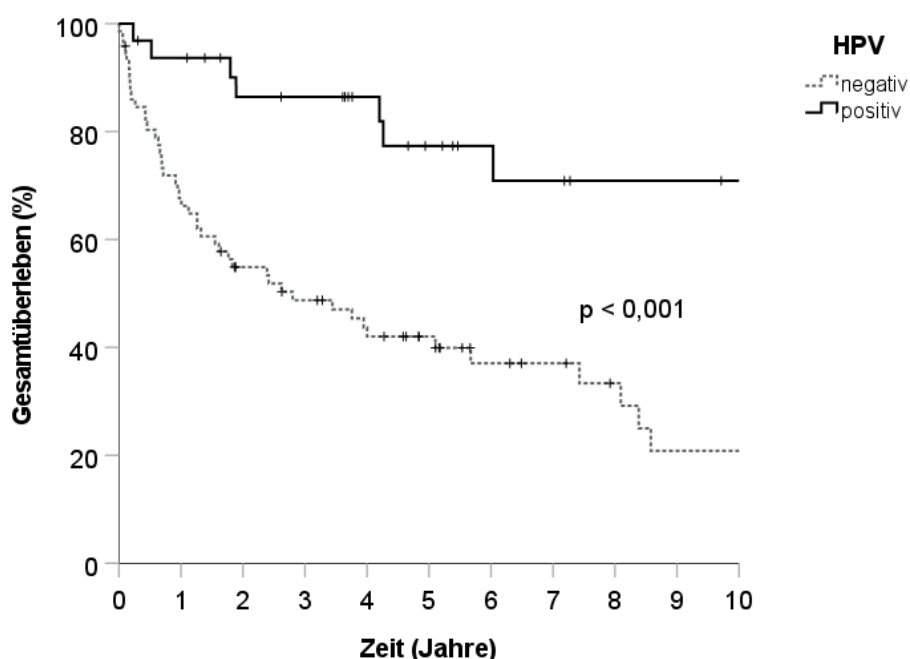


Abbildung 19: Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> in Abhängigkeit vom HPV-Status.  $p = p$ -Wert berechnet mit dem Log Rank-Test.

**Tabelle 17: Einfluss des HPV-Status auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>.**

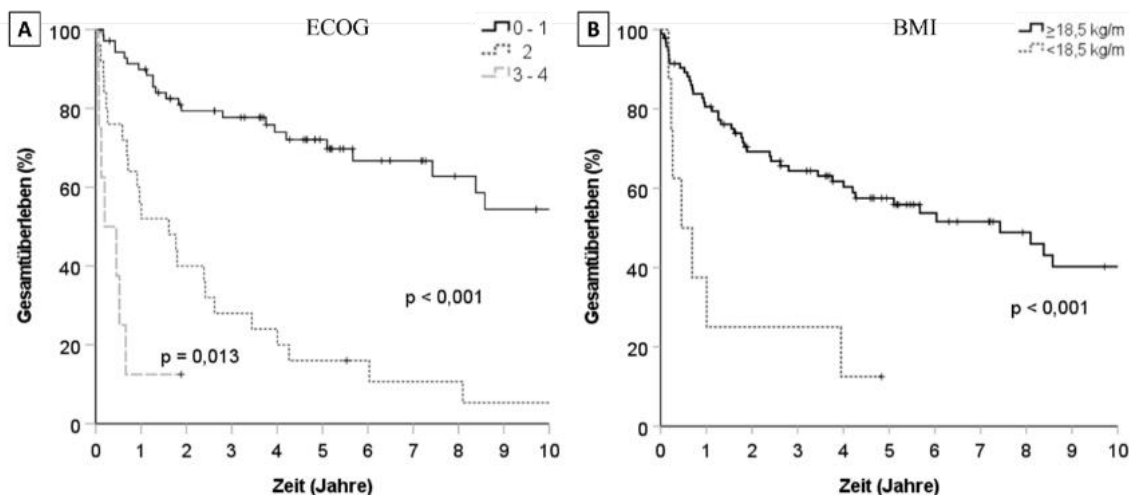
HPV-Status	n	Medianes Überleben in Jahren	Mittleres Überleben in Jahren	3-JÜR (%)	5-JÜR (%)	10-JÜR (%)
HPV-positiv	32	- <sup>1</sup>	10,4	86	77	71
HPV-negativ	72	2,8	5,3	49	40	21
Gesamt	104	5,7	7,1	60	56	37

3-, 5-, 10-JÜR = drei-, fünf- bzw. zehn-Jahres-Überlebensrate; <sup>1</sup> = Die mediane Überlebenszeit konnte nicht berechnet werden, da weniger als 50% der Patienten im Beobachtungszeitraum verstarben.

### 3.8.2 Überlebenszeit in Abhängigkeit vom ECOG-Status und BMI

Für die Analyse der Überlebenszeit in Abhängigkeit vom ECOG-Status wurden die Patienten in drei Gruppen aufgeteilt: Patienten mit geringen Einschränkungen im Alltag (ECOG-Status 0 oder 1), Patienten mit Einschränkungen, wobei eine Selbstversorgung möglich war (ECOG-Status 2) und pflegebedürftigen Patienten (ECOG-Status 3 oder 4). Es zeigen sich hierbei signifikante Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben: Je größer die Einschränkung der Patienten im Alltag, desto schlechter das Gesamtüberleben (Abbildung 20A).

Auch der Ernährungszustand der Patienten hat einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben: Zwischen den Gruppen von normalgewichtigen, präadipösen und adipösen Patienten ergibt sich kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben (nicht dargestellt), daher wurden diese Gruppen zusammengefasst. Patienten in einem untergewichtigen Ernährungszustand zeigen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu Patienten mit einem normalen bis übergewichtigen Ernährungszustand ( $BMI \geq 18,5 \text{ kg/m}^2$ , Abbildung 20B).



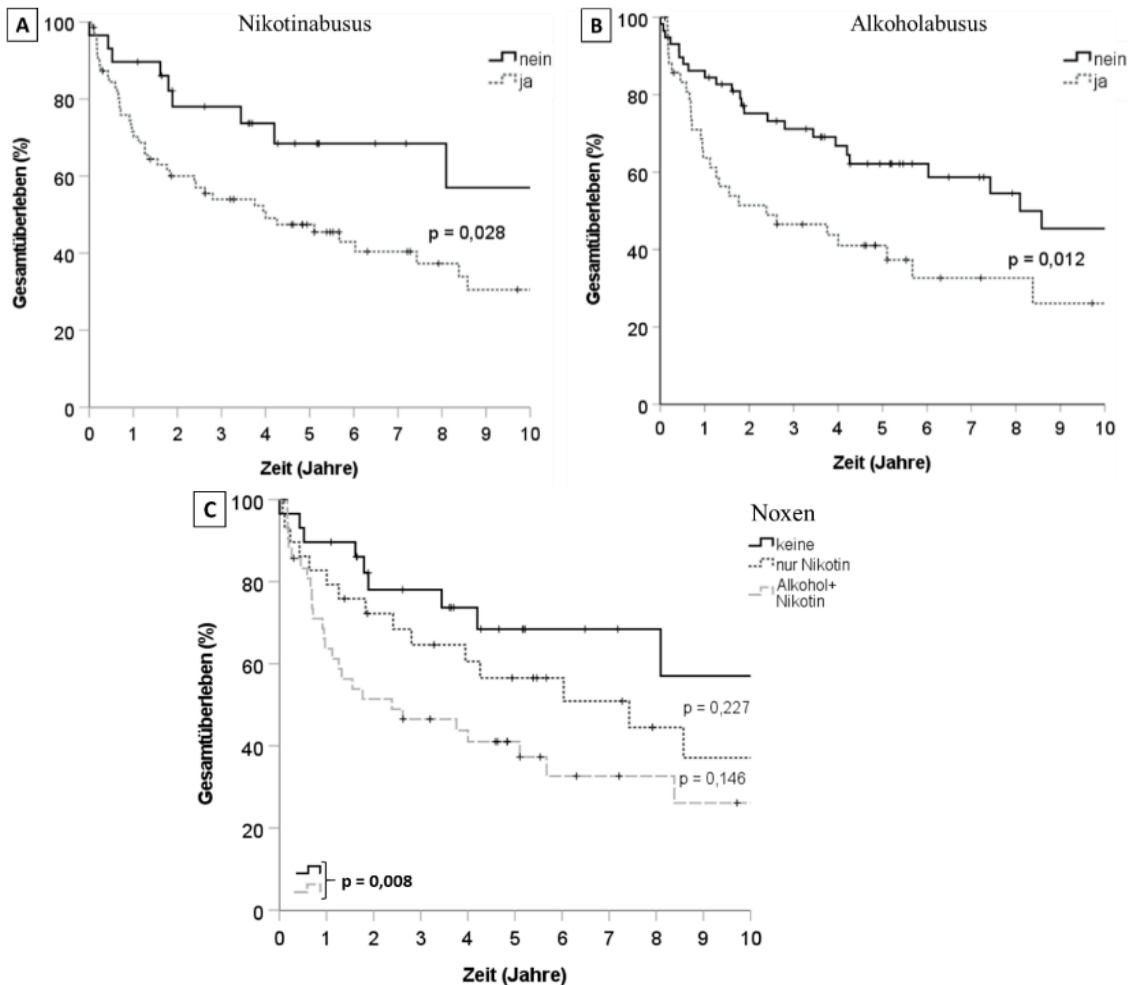
**Abbildung 20: Einfluss des Allgemein- und Ernährungszustands auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>.** A: Einfluss des ECOG-Status auf das Gesamtüberleben; ECOG 0-1 entspricht keinen/geringen Einschränkungen im Alltag; ECOG 2 bedeutet, dass eine Selbstversorgung noch möglich ist; ECOG 3 -4 entspricht einem pflegebedürftigen Patienten (näheres in Tabelle 5); B: Einfluss des Ernährungszustands (BMI) auf das Gesamtüberleben; BMI <math>< 18,5 \text{ kg/m}^2</math> entspricht einem untergewichtigen Ernährungszustand; BMI  $\geq 18,5 \text{ kg/m}^2$  entspricht einem normalen bis übergewichtigen Ernährungszustand (näheres in Abbildung 13);  $p = p$ -Wert berechnet mit dem Log Rank-Test.

### 3.8.3 Überlebenszeit in Abhängigkeit von Nikotin- und Alkoholabusus

Es kann ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten ohne Nikotinabusus ( $p = 0,028$ ) sowie für Patienten ohne Alkoholabusus ( $p = 0,012$ ) in der Anamnese festgestellt werden (Abbildung 21).

Um den Einfluss der beiden Noxen detaillierter beurteilen zu können wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt: Patienten ohne Noxen, Patienten, die nur Nikotin konsumierten und Patienten mit Nikotin- und Alkoholabusus. Ein Effekt von ausschließlichem Alkoholabusus kann nicht untersucht werden, da diese Patientengruppe im Kollektiv nicht vertreten war (Abbildung 14). Patienten mit kombiniertem Nikotin- und Alkoholabusus zeigen das schlechteste Gesamtüberleben, Patienten ohne Noxen das Beste. Zwischen diesen beiden Gruppen verläuft die Überlebenskurve für Patienten, die lediglich Nikotinabusus aufweisen, jedoch ohne dass der Unterschied zu den benachbarten Gruppen eine statistische Signifikanz erreicht (Abbildung 21C).

## Ergebnisse



**Abbildung 21:** Einfluss von Nikotin- und Alkoholabusus auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>. Jeweils einzeln betrachteter Einfluss von Nikotin- (A) bzw. Alkoholabusus (B) auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>. In C zeigt sich der synergistische Einfluss von Nikotin und Alkohol bei der gleichzeitigen Betrachtung beider Risikofaktoren.  $p = p$ -Wert berechnet mit dem Log Rank-Test.

### 3.8.4 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Tumorgröße, Fernmetastasierung und dem Erkrankungsverlauf

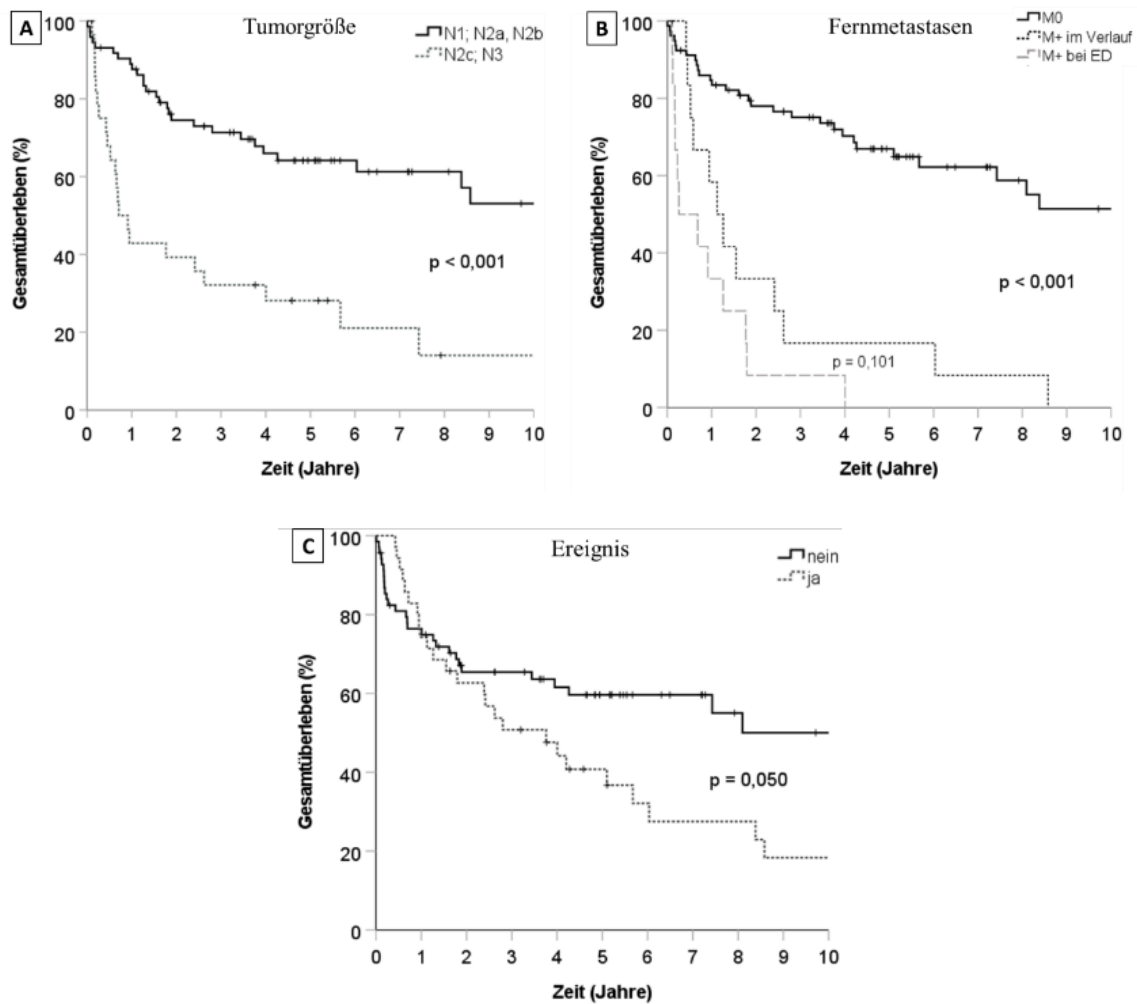
Für die Untersuchung des Einflusses der Tumorgröße auf das Gesamtüberleben erfolgte die Unterteilung der Tumore in kleine, ipsilaterale Tumore (N1-N2b) und große und/oder bilaterale Tumore (N2c-N3). Es kann ein signifikant besseres Gesamtüberleben für Patienten mit geringerer Tumorlast gezeigt werden ( $p < 0,001$ ; Abbildung 22A).

Es wird ein signifikant besseres Gesamtüberleben für Patienten ohne Auftreten von Fernmetastasen im Verlauf bzw. ohne Fernmetastasen bei Erstdiagnose festgestellt ( $p < 0,001$ ). Patienten mit Fernmetastasierung zum Diagnosezeitpunkt zeigen ein

## Ergebnisse

schlechteres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten, bei welchen die Fernmetastasierung erst im Rahmen der Nachsorge diagnostiziert wird. Dieser Unterschied erreicht jedoch in der statistischen Analyse nur knapp das Signifikanzniveaus eines Trends ( $p = 0,101$ ; Abbildung 22B).

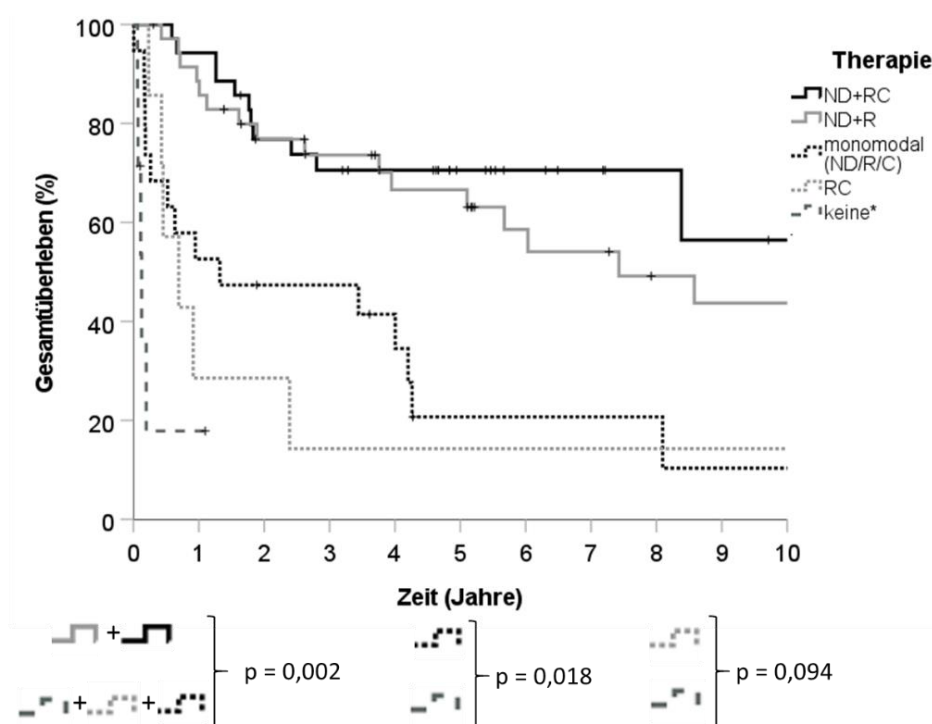
Bei 35 Patienten (33,7%) wurde mindestens ein Ereignis (Rezidiv, Zweittumor, Fernmetastasierung) in der Tumornachsorge festgestellt. Ein solches Ereignis geht mit einem schlechteren Gesamtüberleben einher ( $p = 0,050$ ; Abbildung 22C)



**Abbildung 22: Einfluss der Tumorstadium, Fernmetastasierung und des weiteren Erkrankungsverlauf auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>.** A: Tumorstadium, B: Fernmetastasierung; C: Krankheitsverlauf; ED = Erstdiagnose CUP<sub>HNSCC</sub>; im Verlauf = Fernmetastasierung wurde nach Erstdiagnose im Rahmen der Nachsorge diagnostiziert; Zu C: Als Ereignis wurde ein Rezidiv, eine Fernmetastasen, ein Zweittumor und nach Therapieende festgestelltes Residuum einbezogen.  $p = p$ -Wert berechnet mit dem Log Rank-Test.

### 3.8.5 Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Therapie

Patienten, die mit einer Kombination aus Neck-Dissection und Radio- bzw. Radiochemotherapie behandelt wurden, zeigen das beste Gesamtüberleben. Das schlechteste Gesamtüberleben zeigen Patienten, die eine Therapie ablehnten. Auch Patienten, die eine monomodale Therapie oder eine Kombination aus Radio- und Chemotherapie erhielten, zeigen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten, die mit einem multimodalen Konzept therapiert wurde (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Einfluss der Therapie auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>.** ND = Neck-Dissection; R = Radiotherapie; C = Chemotherapie; RC = Radiochemotherapie; \* = Therapie wurde i.d.R. vom Patienten nach ausführlicher Aufklärung abgelehnt. p = p-Wert berechnet mit dem Log Rank-Test.

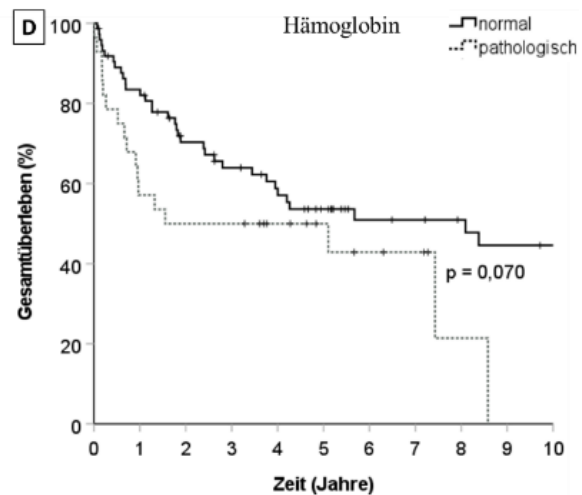
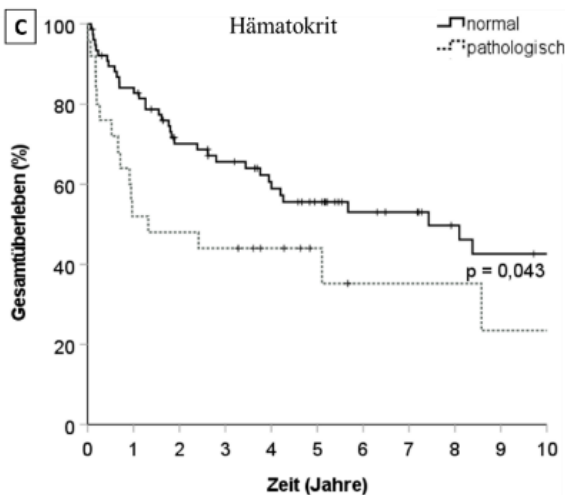
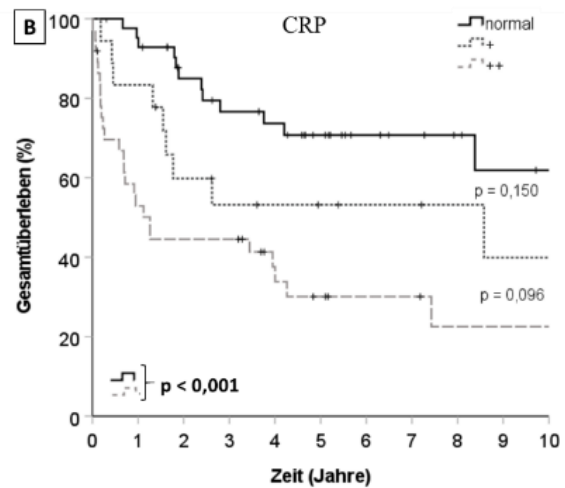
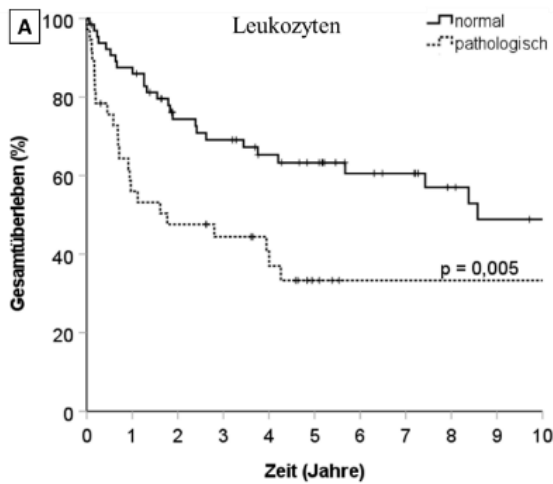
### 3.8.6 Überlebenszeit in Abhängigkeit von den Laborparametern

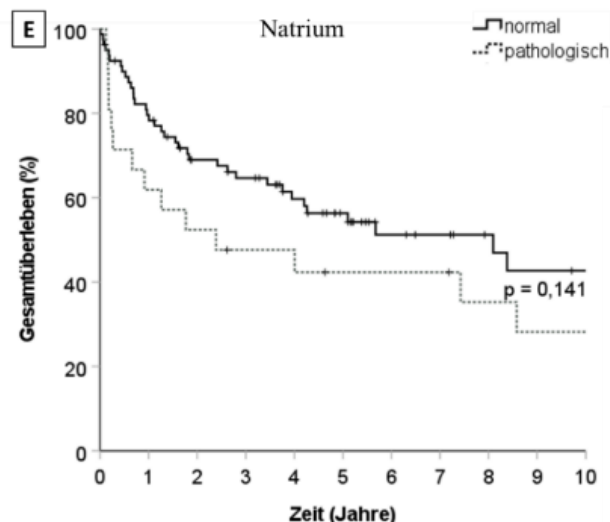
Für jeden Laborparameter wurde das Kollektiv aufgeteilt in Patienten mit normalen oder pathologischen Werten (Tabelle 12). Ein signifikanter Überlebensvorteil kann für Patienten mit normalwertigem CRP- (p = 0,001) und Leukozytenwert (p = 0,005) gegenüber Patienten mit jeweils pathologischen Werten nachgewiesen werden. Beim CRP kann zudem ein Überlebensvorteil für Patienten mit leicht erhöhtem CRP-Wert gegenüber denen mit stark erhöhtem CRP-Wert festgestellt werden, wobei in der

## Ergebnisse

statistischen Analyse nur das Signifikanzniveau eines Trends erreicht wird ( $p = 0,096$ ). Der Unterschied zwischen Patienten mit normalem CRP und Patienten mit stark erhöhtem CRP ist dagegen signifikant ( $p < 0,001$ ). Die entsprechenden Kaplan-Meier-Grafen sind in Abbildung 24A-B dargestellt.

Ein signifikanter Überlebensvorteil kann außerdem für Patienten mit normwertigem Hämatokrit ( $p = 0,043$ ) aufgezeigt werden (s Abbildung 24C). Es bestehen zudem Unterschiede mit besserem Gesamtüberleben für Patienten mit normwertigem Hämoglobin ( $p = 0,070$ ) bzw. Natrium ( $p = 0,141$ ) im Vergleich zu Patienten mit pathologischen Werten (s Abbildung 24D-E). Diese Unterschiede erreichen jedoch in der statistischen Analyse nicht das Signifikanzniveau.



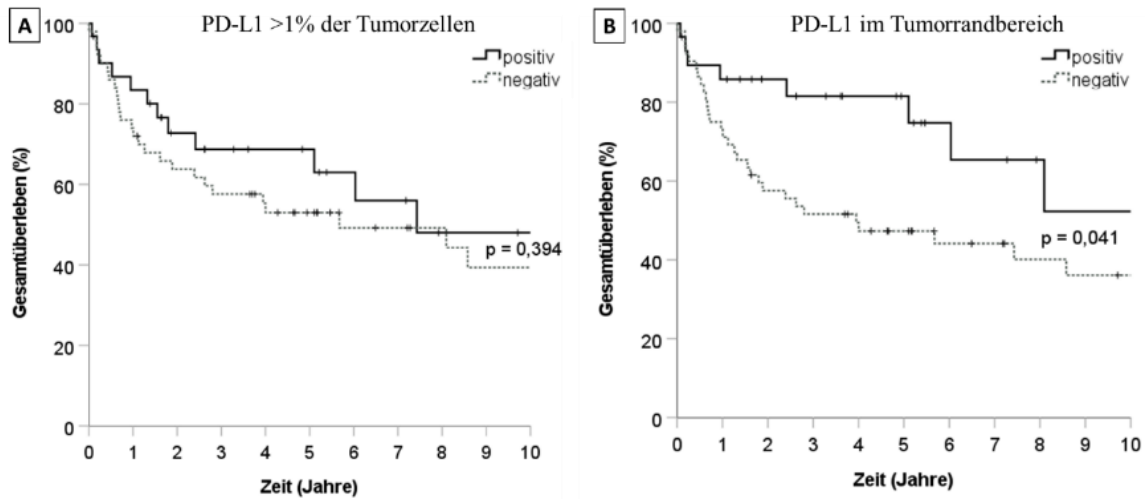


**Abbildung 24:** Einfluss prognoserelevanter Laborwerte auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>. A: Leukozytenwert, B: CRP, C: Hämatokrit, D: Hämoglobin und E: Natrium; Zu A, C, D, E: Unter der Kategorie „pathologisch“ wurden alle Patienten zusammengefasst, die eine Abweichung der untersuchten Parameter von den Normwertem aus Tabelle 12 aufwiesen. Zu B: CRP normal ( $> 5\text{mg/l}$ ); + = leichten Erhöhung des CRP ( $> 5 \leq 10\text{mg/l}$ ); ++ = starke Erhöhung des CRP ( $> 10\text{mg/l}$ ).  $p = p$ -Wert berechnet mit dem Log Rank-Test.

### 3.8.7 Überlebenszeit in Abhängigkeit von PD-L1

Es kann kein signifikanter Einfluss bezüglich des PD-L1-Status von Tumorzellen auf das Gesamtüberleben festgestellt werden (Abbildung 25A). Bei der Bewertung des Tumorrandbereichs zeigt sich jedoch ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit PD-L1-Positivität im Tumorrandbereich (Abbildung 25B). Dieser Unterschied kann jedoch in der Gruppe HPV-positiver bzw. -negativer CUP<sub>HNSCC</sub> nicht mehr festgestellt werden (Tabelle 20).

## Ergebnisse



**Abbildung 25:** Einfluss von PD-L1-positiven Tumorzellen (A) bzw. PD-L1-positiven Zellen im Tumorrandbereich (B) auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>.  $p = p$ -Wert berechnet mit dem Log Rank-Test.

### 3.8.8 Überlebenszeit in Abhängigkeit von MHC I, MHC II und LAG 3

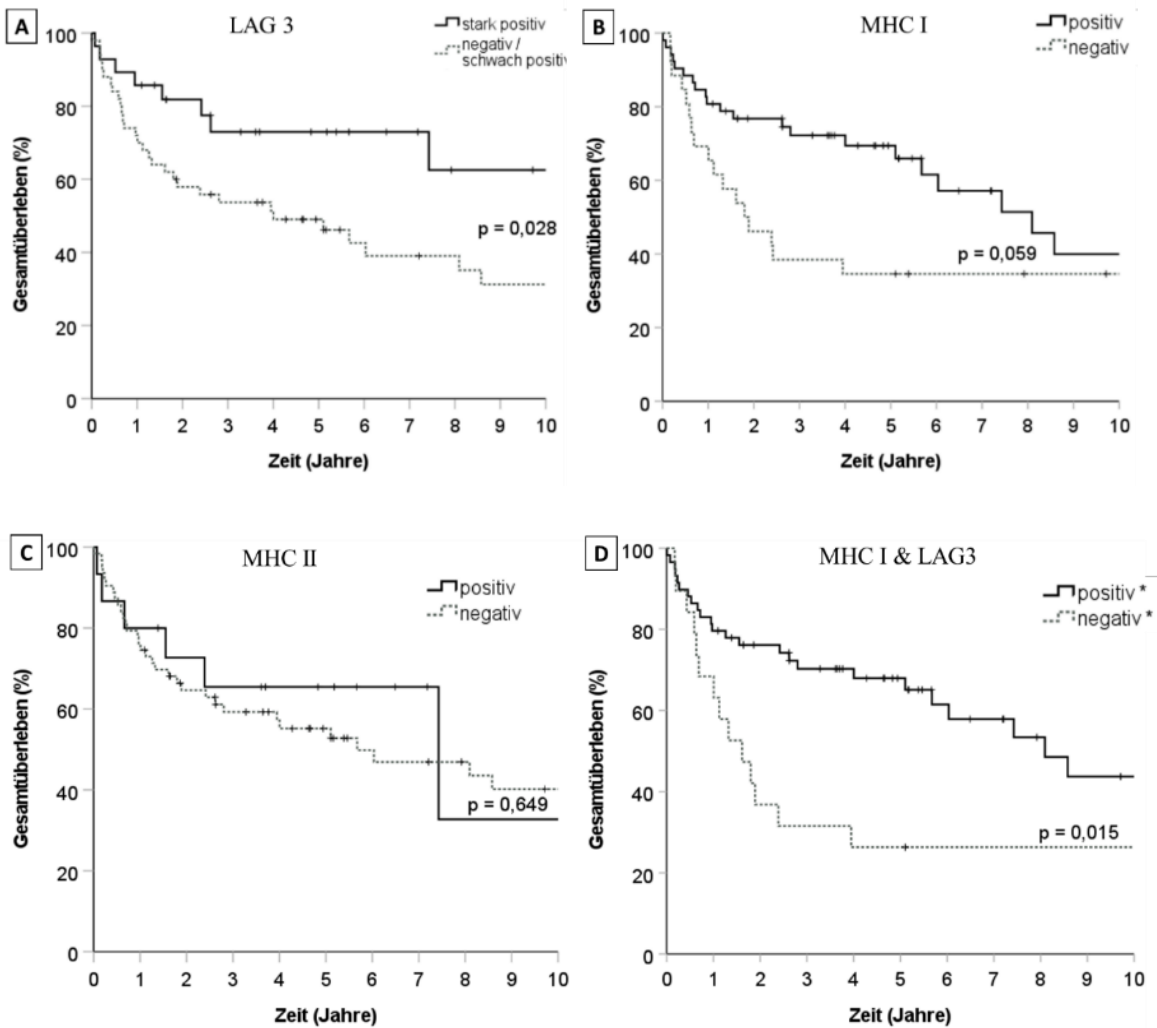
Es kann ein signifikanter Vorteil für das Gesamtüberleben von CUP<sub>HNSCC</sub>-Patienten mit starker LAG 3-Positivität im Vergleich zu CUP<sub>HNSCC</sub>-Patienten mit schwacher/keiner LAG 3-Positivität festgestellt werden ( $p = 0,028$ , Abbildung 26A; 3.6.2).

In unserem Kollektiv zeigt sich für Patienten mit MHC I-Expression ein besseres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten ohne MHC I-Expression. Diese Unterschiede erreichten jedoch nur das Signifikanzniveau eines Trends ( $p = 0,059$ , Abbildung 26B).

Für MHC II können in der Gesamtüberlebensanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen MHC II-positiven und -negativen CUP<sub>HNSCC</sub> gefunden werden (Abbildung 26C).

Bei Zusammenschau der Zellmarker MHC I und LAG 3 zeigt sich für Patienten, deren CUP<sub>HNSCC</sub> sowohl für MHC I als auch für LAG 3 negativ waren, ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten, deren CUP<sub>HNSCC</sub> für mindestens einen Marker positiv getestet wurde ( $p = 0,015$ , Abbildung 26D). Insbesondere für Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub> ist die Positivität von MHC I, LAG 3 oder der Kombination der beiden Zellmarker mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert (Tabelle 20).

## Ergebnisse



**Abbildung 26:** Einfluss von LAG 3, MHC I und MHC II auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>. A: LAG 3, B: MHC I, C: MHC II und D: der Zusammenschau von MHC I und LAG 3; \* = Als positiv wurden hier alle Patienten zusammengefasst, die bei der MHC I- und/oder LAG 3-Auswertung positive Ergebnisse zeigten. Alle Patienten mit negativen Ergebnissen bei MHC I und LAG 3 wurden dementsprechend negativ gewertet. p = p-Wert berechnet mit dem Log Rank-Test.

### 3.9 Faktoren mit prognostischer Relevanz bei CUP<sub>HNSCC</sub>

Tabelle 18 gibt einen Überblick über den Einfluss verschiedener Faktoren auf das Gesamtüberleben unserer Patienten. Einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben zeigt sich für den HPV-Status, ECOG, BMI, Nikotin- und Alkoholabusus, Tumorgröße (N-Status), Fernmetastasierung (M-Status), Leukozyten, CRP, Hämatokrit, PD-L1 im Tumorrandbereich, LAG 3 sowie Positivität für MHC I und/oder LAG 3.

## Ergebnisse

Für folgende Merkmale konnte kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben von Patienten unseres Kollektivs gefunden werden: Alter, Geschlecht, andere onkologische Ereignisse in der Anamnese, PD-L1  $\geq$  1% der Tumorzellen, MHC II sowie zwischen pathologischen und normwertigen Laborparameter für Thrombozyten, partielle Thromboplastinzeit (PTT) und Erythrozytenzahl.

**Tabelle 18: Univariate Überlebensanalyse**

Parameter		N		Überlebenszeit (J) Median	3-JÜR (%)	5-JÜR (%)	p <sup>a</sup>	KI			p <sup>b</sup>	*
								HR	UG	OG		
Alter	Durchschnitt	104	63,4	62,7				1,005	0,98	1,03	0,724	
Geschlecht	m	104	79	5,7	57	54	0,529	1	1	1	0,53	
	w	104	25	4,3	70	47		0,808	0,42	1,57		
ECOG	0-1	104	71	14,4	77	70	< 0,001	1	1	1	< 0,001	*
	2-4	104	33	0,9	23	13		5,592	3,2	9,76		
BMI	$\geq$ 18,5	102	86	7,4	37	26	0,002	1	1	1	0,005	*
	< 18,5	102	16	1,0	66	57		3,961	1,75	8,98		
Nikotin	<10PY	101	29	-	78	68	0,028	1	1	1	0,032	*
	$\geq$ 10PY	101	72	4,0	54	47		2,201	1,07	4,52		
Alkohol	nein	101	58	8,1	71	62	0,012	1	1	1	0,014	*
	ja	101	43	2,4	46	41		1,998	1,15	3,47		
N-Status	N1-N2b	102	73	8,6	70	62	< 0,001	1	1	1	< 0,001	*
	N2c-N3	102	29	0,7	32	28		1,798	1,36	2,38		
M-Status (ED)	M0	104	91	8,1	67	60	< 0,001	1	1	1	< 0,001	*
	M1	104	13	0,3	10	0		6,207	3,12	12,3		
HPV	neg	104	72	2,8	49	40	< 0,001	1	1	1	< 0,001	*
	pos	104	32	-	86	77		0,238	0,11	0,53		
PD-L1	neg	81	50	5,7	58	53	0,394	1	1	1	0,396	
	pos	81	31	7,4	69	69		0,743	0,38	1,47		
PD-L1 Randbereich	neg	81	52	3,9	52	47	0,041	1	1	1	0,046	*
	pos	81	29	-	82	81		0,452	0,21	0,99		
MHC I	neg	78	26	1,7	39	34	0,059	1	1	1	0,063	
	pos	78	52	8,1	72	69		0,544	0,29	1,03		
MHC II	neg	78	63	5,7	59	53	0,649	1	1	1	0,65	
	pos	78	15	7,4	66	65		0,817	0,34	1,96		
LAG 3	neg	78	50	4,0	54	49	0,028	1	1	1	0,033	
	pos	78	28	-	73	73		0,427	0,2	0,93		
MHC I /LAG 3	neg	78	19	1,6	33	26	0,015	1	1	1	0,017	*
	pos	78	59	8,1	70	68		0,447	0,23	0,87		
Therapie	mono	97	19	1,3	67	62	< 0,001	1	1	1	< 0,001	
	mult	97	78	8,4	47	21		0,275	0,16	0,48		

## Ergebnisse

Parameter		N		Überlebenszeit (J) Median	3-JÜR (%)	5-JÜR (%)	p <sup>a</sup>	KI			p <sup>b</sup>	*
								HR	UG	OG		
Neck-Dissection	nein	104	24	0,5	20	10	< 0,001	1	1	1	< 0,001	
	ja		80	8,6	71	65		0,181	0,1	0,32		
Radiotherapie	nein	104	88	0,2	43	23	0,002	1	1	1	0,003	
	ja		16	7,4	63	56		0,367	0,19	0,72		
Chemotherapie	nein	104	57	5,1	58	51	0,333	1	1	1	0,335	
	ja		47	8,4	62	55		0,762	0,44	1,32		
Rezidiv	nein	104	91	8,1	23	56	0,011	1	1	1	0,013	
	ja		13	2,4	66	23		2,364	1,2	4,67		
M-Status (Verlauf)	M0	104	79	14,4	75	65	< 0,001	1	1	1	< 0,001	
	M+		25	0,9	13	10		5,779	3,29	10,2		
Leukozyten	norm	102	65	8,4	69	61	0,005	1	1	1	0,006	
	path.		37	1,8	44	33		2,192	1,25	3,84		
CRP	norm	98	43	-	77	67	0,001	1	1	1	0,002	
	path.		55	1,8	48	38		2,742	1,47	5,12		
HB	norm	102	74	8,1	64	54	0,07	1	1	1	0,073	
	path.		28	1,6	50	50		1,711	0,95	3,08		
HKT	norm	102	77	7,4	64	56	0,043	1	1	1	0,046	
	path.		25	1,3	44	44		1,829	1,01	3,31		
Natrium	norm	101	80	8,5	65	54	0,141	1	1	1	0,145	
	path.		21	2,4	48	43		1,587	0,85	2,95		

\* = Faktoren wurden in die Multivariate Analyse einbezogen; HR = Hazard Ratio, geschätzt mit dem Cox-proportional-hazards-Model; KI = 95% Konfidenzintervall; J = Jahre; UG = untere Grenze; OG = obere Grenze; 3-/5-JÜR = 3-/5-Jahres-Überlebensrate; pos = positiv; neg = negativ, path. = pathologisch; norm = normal; PY = packyears; m = männlich; w = weiblich; mono = monomodales Therapiekonzept; multi = multimodales Therapiekonzept; <sup>a</sup> = p-Wert berechnet mit Log Rank Test (Mantel-Cox), univariate; p < 0.05 fett; <sup>b</sup> = p-Wert geschätzt mit dem Cox-proportional-hazards-Model, uni- und multivariate; p < 0.05 fett.

### 3.9.1 Multivariate Analyse

In der multivariaten Analyse werden mehrere mögliche Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben im Zusammenspiel berücksichtigt, um Zusammenhangs- oder Abhängigkeitsstrukturen zwischen den Faktoren zu erkennen. Hierzu wurde die Cox-Regressionsanalyse verwendet. In einem ersten Modell wurden alle Faktoren eingeschlossen, die in der univariaten COX-Analyse ein signifikantes Niveau erreichten und bereits zum Diagnosezeitpunkt erhoben wurden. Faktoren, die erst im weiteren Krankheitsverlauf auftraten (z.B. Rezidiv) oder die aufgrund der Primärdiagnose

entschieden wurden (z.B. die Therapie), wurden für die Berechnung ausgeschlossen. Die Blutlaborwerte wurden in der multivariaten Analyse ebenfalls ausgeschlossen, da diese Faktoren einem starken Einfluss exogener Faktoren wie beispielsweise Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand unterliegen und somit nicht als unabhängige Faktoren betrachtet werden können.

Zur Reduktion der Komplexität des Modells wurde Schritt für Schritt jeweils der Faktor mit dem größten p-Wert ausgeschlossen und das Modell erneut berechnet (Tabelle 19). Wie bereits beschrieben, besteht eine Assoziation zwischen BMI und ECOG-Status sowie zwischen Alkohol und Nikotin, daher wurden diese Variablen für die multivariate Analyse zuerst einzeln berücksichtigt und in einer weiteren Modellberechnung in einem Interaktionsterm zusammengeschlossen. Dabei zeigte sich, dass Alkohol und Nikotin – sowohl einzeln betrachtet als auch als Interaktionsterm – nach Ausschluss nicht signifikanter Faktoren nicht im Modell verblieben. Daher wurden diese Faktoren für die Berechnung eines zweiten Ausgangsmodells nicht eingeschlossen (Tabelle 19). Bei einzelner Betrachtung entfiel der BMI, der ECOG-Status verblieb im Modell. Der Interaktionsterm von ECOG und BMI verblieb nach Ausschluss nicht signifikanter Faktoren in dem Modell, so dass von einem ausreichenden Zusammenhang der beiden Faktoren ausgegangen werden kann. Für die Berechnung des zweiten Modells wurde daher nur der ECOG-Status weiter berücksichtigt.

Im zweiten Schritt der Modellierung entfielen im Zuge des Ausschlusses nicht signifikanter Faktoren nacheinander M-Status und PD-L1. Neben dem HPV-Status konnte schließlich ein signifikanter Einfluss vom N- und ECOG-Status sowie der „Kombinationvariablen“ aus den Zellmarkern MHC I/LAG 3 nach Ausschluss der nicht signifikanten Faktoren nachgewiesen werden. Diese Parameter können somit bei Patienten mit  $CUP_{HNSCC}$  als unabhängige Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben betrachtet werden (Tabelle 19).

Tabelle 19: Multivariate Analyse

Parameter		Erstes Multivariates Anfangsmodell mit allen einbezogenen Faktoren				p	*	Zweites Multivariates Anfangsmodell				p	*	Multivariates Modell nach Ausschluss nicht signifikanter Faktoren				p
		KI			p			KI			p			KI			p	
		HR	UG	OG				HR	UG	OG				HR	UG	OG		
ECOG	0-1	1	1	1	<b>&lt; 0,001</b>		1	1	1	<b>&lt; 0,001</b>		1	1	1	<b>&lt; 0,001</b>			
	2-4	5,48	2,49	12,04			5,34	2,60	10,94			5,34	2,60	10,94				
BMI	≥ 18,5	1	1	1	0,458	*												
	< 18,5	1,50	0,51	4,43														
Nikotin	<10PY	1	1	1	0,457	*												
	≥10PY	1,51	0,51	4,46														
Alkohol	nein	1	1	1	0,897	*												
	ja	1,06	0,13	2,65														
N-Status	N1-N2b	1	1	1	0,119		1	1	1	<b>0,044</b>		1	1	1	<b>0,013</b>			
	N2c-N3	1,43	0,91	2,24			1,53	1,01	2,33			1,60	1,11	2,32				
M-Status (ED)	M0	1	1	1	0,989		1	1	1	0,769	<b>1</b>							
	M1	1,01	0,33	3,08			1,14	0,42	3,15									
HPV (p16)	negativ	1	1	1	<b>0,038</b>		1	1	1	<b>0,016</b>		1	1	1	<b>0,011</b>			
	positiv	0,31	0,11	0,94			0,28	0,10	0,79			0,27	0,10	0,74				
PD-L1 Randbereich	negativ	1	1	1	0,673		1	1	1	0,66	<b>2</b>							
	positiv	0,81	0,30	2,18			0,81	0,38	2,03									
MHC I /LAG 3	negativ	1	1	1	0,054		1	1	1	<b>0,0115</b>		1	1	1	<b>0,003</b>			
	positiv	0,42	0,17	1,02			0,35	0,15	0,68			0,32	0,15	0,68				

KI = Konfidenzintervall; UG = untere Grenze; OG = obere Grenze; \* = Ausschluss an dieser Position, näheres siehe Text; p = p-Wert geschätzt mit dem Cox-proportional-hazards-Model, multivariat,  $p < 0,05$  fett.

### 3.9.2 Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>, stratifiziert nach dem HPV-Status

HPV hat bekanntermaßen einen großen Einfluss auf die Prognose der Patienten, da HPV-positive und -negative Tumoren sich molekular und in der Onkogenese grundlegend unterscheiden, sodass die TMN-Klassifikation diese mittlerweile getrennt betrachtet. Die getrennte Auswertung der HPV-positiven und -negativen CUPs ist dahingehend wichtig, um die Bedeutung anderer Faktoren für die Gruppe der HPV-positiven bzw. -negativen CUPs bewerten zu können. Tabelle 20 gibt einen Überblick, welche Faktoren eine

## Ergebnisse

Bedeutung für das Gesamtüberleben für Patienten mit HPV-positiven und -negativen CUP<sub>HNSCC</sub> haben.

**Tabelle 20: Prognostische Faktoren mit Einfluss auf das Gesamtüberleben im Vergleich bei CUP<sub>HNSCC</sub> mit positivem und negativem HPV-Status.**

Parameter		HPV+		HPV-	
		5-JÜR (%)	p	5-JÜR (%)	p
ECOG*	0-1	90	< 0,001	62	< 0,001
	2-4	33		8	
BMI*	≥ 18,5 kg/m <sup>2</sup>	80	< 0,001	47	0,036
	< 18,5 kg/m <sup>2</sup>	0		14	
Nikotin*	< 10PY	68	0,498	67	0,063
	≥ 10PY	86		38	
Alkohol*	nein	74	0,262	52	0,075
	ja	100		36	
N-Status*	N1-N2b	79	0,015	52	0,006
	N2c-N3	50		25	
M-Status*	M0	83	< 0,001	49	< 0,001
	M1	0		0	
Leukozyten*	normal	75	0,62	53	0,004
	pathologisch	75		23	
CRP*	normal	76	0,833	68	0,001
	pathologisch	79		26	
HKT*	normal	76	0,898	46	0,061
	pathologisch	80		35	
PD-L1 im Randbereich*	negativ	78	0,729	35	0,084
	positiv	93		70	
MHC I	negativ	70	0,405	13	0,002
	positiv	94		59	
LAG 3*	negativ	80	0,353	36	0,059
	positiv	92		61	
MHC I/ LAG 3*	negativ	67	0,493	8	0,001
	positiv	90		57	
Neck-Dissection*	nein	22	0,001	7	< 0,001
	ja	91		53	
Radiotherapie*	nein	100	0,442	10	< 0,001
	ja	76		49	

5-JÜR = 5-Jahres-Überlebensrate; PY = Packyears; \* = Faktoren. Die für die Gesamtkohorte signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben zeigen; p = p-Wert berechnet mit Log Rank Test (Mantel-Cox), univariate, p < 0.05 fett.

Faktoren, die gleichermaßen einen Einfluss auf das Gesamtüberleben der vollständigen Kohorte (Tabelle 18 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) als auch jeweils für die Gruppen der Patienten mit HPV-positivem und -negativem CUP<sub>HNSCC</sub> haben, sind der ECOG-Status, BMI, N-Status, M-Status sowie eine Neck-Dissection als Bestandteil der Therapie.

Die Gruppe der Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub> weist grundsätzlich eine schlechtere Prognose auf. Es bestehen Faktoren mit signifikantem Einfluss auf das Gesamtüberleben für diese Patientengruppe: Patienten mit einer Inflammation (pathologischer Leukozyten- oder CRP-Wert) zeigen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben. Der Zellmarker MHC I und die Kombination von MHC I/LAG 3 zeigen einen günstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben bei negativem HPV-Status. Auch die Faktoren Nikotin, Alkohol, ein pathologischer Hämatokrit sowie Negativität für die Zellmarker PD-L1 im Tumorrandbereich und LAG 3 zeigen sich jeweils assoziiert mit einem schlechten Einfluss auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub>, wobei in der statistischen Analyse jeweils nur das Niveau eines Trends erreicht wird. Es werden keine Faktoren identifiziert, die lediglich bei Patienten mit positivem HPV-Status, nicht aber bei HPV-negativen CUP<sub>HNSCC</sub> für das Gesamtüberleben von signifikanter Bedeutung sind (Tabelle 20).

---

## 4 Diskussion

Als wichtige Risiko- und Prognosefaktoren bei der Entstehung von KHT sind u.a. der HPV-Status und Nikotinkonsum seit längerem bekannt. CUP<sub>HNSCC</sub> ist eine Untergruppe der KHT, bei welcher bisher vergleichsweise wenig zu prognostischen Faktoren erforscht ist. Um diese Untergruppe näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit Gewebeproben von 104 Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> auf HPV untersucht. Zudem wurden weitere Aspekte wie Lifestyle-Risikofaktoren, Tumorcharakteristika und routinemäßig erhobene Blutlaborwerte auf ihre prognostische Aussagekraft bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> analysiert. Ferner wurde die prognostische Aussagekraft des Membranproteins PD-L1 untersucht. Seit der Zulassung von Immuntherapien zur Therapie von KHT, welche sich gegen PD-1/PD-L1 richten, gewinnt dieser Biomarker zunehmend an Bedeutung.

### 4.1 HPV-Status des CUP<sub>HNSCC</sub>-Kollektivs

Es gibt bisher keinen endgültigen Konsens über die in der klinischen Praxis zu verwendenden HPV-Nachweismethoden. Grundsätzlich ist der Nachweis von HPV nicht immer mit einer (Prä-) Kanzerose gleichzusetzen. HPV kann sowohl als Kontamination dem Gewebe aufliegen als auch als oberflächliche HPV-Infektion auftreten. Die Mehrzahl der Infektionen verläuft symptomlos. Erst wenn es im Rahmen einer HPV-Infektion zu Geweb dysplasien kommt und biologisch aktive HPV-DNA im Tumorgewebe nachgewiesen werden kann, sollte von einer HPV-getriebenen Tumorerkrankung ausgegangen werden (Robert Koch-Institut 2018). Als anerkannter Surrogatmarker für eine HPV-assoziierte Karzinogenese wird p16<sup>INK4a</sup>-Positivität im klinischen Alltag oftmals mit HPV-Positivität gleichgesetzt. Es bestehen jedoch Unterschiede von bis zu 20% zwischen HPV- und p16<sup>INK4a</sup>-Nachweisen (Tabelle 4). Die parallele Verwendung verschiedener Nachweismethoden (1.2.5) kann zu widersprüchlichen Ergebnissen führen. In dieser Arbeit wurden bis zu drei HPV-Nachweismethoden verwendet (3.2.1). Es zeigen sich bei vier von 104 Fällen HPV-DNA positive-/p16<sup>INK4a</sup>-negative Resultate, welche in der RT-PCR jedoch alle HPV-mRNA-negativ getestet wurden. Die Abwesenheit von biologisch aktiver mRNA legt nahe, dass bei diesen Fällen mutmaßlich von einer Kontamination der PCR-Reaktion durch exogene HPV-DNA ausgegangen werden kann. Dagegen spaltet die Einordnung der häufiger beobachteten HPV-DNA-negativen-/p16<sup>INK4a</sup>-positiven Fällen die

Fachgesellschaften. Eine Kontamination wie bei der PCR ist aufgrund der visuellen Kontrolle bei der IHC ausgeschlossen. Mollenhauer et al. propagieren eine p16<sup>INK4a</sup>-Positivität als „ausreichend[e] und sogar überlegene HPV-Nachweismethode“ und legen somit die Einordnung der diskordanten Fälle (HPV-DNA-/p16<sup>INK4a</sup>+) als HPV-Positive nahe (Mollenhauer et al. 2014). Unterstützt bzw. angewendet wird diese Annahme durch die 8. Auflage der TNM-Klassifikation, in welcher erstmals zwischen p16<sup>INK4a</sup>-positiven und -negativen Tumoren unterschieden wird. Für die Zuordnung wird hierbei lediglich der Surrogatmarker p16<sup>INK4a</sup> herangezogen und keine weitere Unterscheidung in HPV-DNA-positiv und -negativ gefordert (Wittekind 2017). In unserem Kollektiv zeigen sich für diese diskordanten Fälle ähnliche Eigenschaften und Verläufe wie bei p16<sup>INK4a</sup>-positiven/HPV-DNA-positiven Fällen, insbesondere für die Überlebensanalyse (Abbildung 9), aber auch bezüglich der wichtigen Risikofaktoren Nikotin- und Alkoholabusus. Aufgrund dieser Übereinstimmungen und der Einteilung der aktuellen TNM-Klassifikation wurden die p16<sup>INK4a</sup>-positiven/HPV-DNA-negativen Fälle in dieser Arbeit als mutmaßlich HPV-positiv gewertet. In einer Metaanalyse von Ren et al. 2019 sank die Rate der HPV-positiven Fälle bei CUP<sub>HNSCC</sub> von 40-60% auf 17 bzw. 39%, wenn zusätzlich zu p16<sup>INK4a</sup> auch HPV-mRNA oder DNA getestet wurde. In den Studien von Tribius et al., Jensen et al., Sivars et al. und Yasui et al. wurden zwischen 3% und 21% (durchschnittlich 11,2%) p16<sup>INK4a</sup>-positive und HPV-DNA-negative Fälle beschrieben. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen dieser Arbeit (12%; Tabelle 4). Eine begründete Empfehlung zur Zuteilung der diskordanten Fälle konnte abschließend von keinem der o.g. Autoren getroffen werden, weshalb es unbedingt weiterer Studien mit Fokus auf die Einordnung bzgl. des HPV-Status von p16<sup>INK4a</sup>-positiven, HPV-DNA-negativen Fällen bedarf.

### **4.2 HPV-Prävalenz bei CUP<sub>HNSCC</sub>**

Es zeigen sich deutliche Unterschiede bei der HPV-Prävalenz in verschiedenen Studien zu CUP<sub>HNSCC</sub>, wobei die HPV-Prävalenz in unserem Kollektiv mit 31% gegenüber der in einer Metaanalyse erhobenen durchschnittlichen 43% (18-84%) vergleichsweise niedrig ist (Tabelle 4). Neben den Testmethoden könnten unterschiedliche Studiendesigns ein Erklärungsansatz für die starken Schwankungen der HPV-Prävalenzen sein: Ein Teil der Studien schloss Fälle nicht nachträglich aus, bei welchen ein Primarius im Verlauf gefunden wurde. Ein CUP wurde dann als CUP definiert, wenn initial ein CUP-Syndrom vorlag. Eine Metaanalyse von Rizzo et al. 2015 zeigte, dass der Anteil an HPV-positiven

CUP-Fällen in der Gruppe bei welchen ein Primarius im Verlauf gefunden werden konnte, deutlich höher liegt im Vergleich zu der Gruppe der „echten“ CUPs. Zum Teil ergaben sich so HPV-Prävalenzen von über 80% (Zengel et al. 2012; Weiss et al. 2011).

Mollenhauer et al. kommen zu dem Schluss, dass eine enge Korrelation zwischen initialer klinischer Präsentation als zervikales CUP und HPV-Positivität besteht (Mollenhauer et al. 2014). Dies zeigt sich auch in der Studie von Yasui et al.: Im gesamten Kollektiv – welches zunächst aus „echten“ und „unechten“ CUP-Fällen bestand, also solchen, bei denen im Verlauf ein Primarius gefunden wurde – zeigte sich ein deutlich höherer Anteil an HPV-positiven „unechten“ CUPs (37%) im Vergleich zu den separat betrachteten „echten“ CUP-Fällen (15%). HPV-getriebene KHT metastasieren insgesamt häufiger als HPV-Negative und bilden vergleichsweise große Metastasen (Zengel et al. 2012; Wagner et al. 2016). Im Kollektiv dieser Arbeit wurden Patienten, bei denen im Verlauf ein Primarius gefunden wurde, als „unechte“ CUP-Fälle ausgeschlossen. Zwei Studien teilen dieses Vorgehen und verzeichnen eine HPV-Prävalenz von durchschnittlich etwa 20%, was in etwa dem Ergebnis dieser Arbeit entspricht (Jensen et al. 2014; Vent et al. 2013). So könnte die vergleichsweise niedrige HPV-Prävalenz unseres Kollektivs durch den Ausschluss von Patienten mit im Verlauf diagnostiziertem Primarius erklärt werden und zudem die HPV-Inzidenz bei „echten“ CUP-Fällen in der Literatur oftmals überschätzt sein. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit und im Vergleich mit anderen OPSCC aus Gießen (4.4) scheint eine von Mollenhauer et al. postulierte höhere HPV-Prävalenz des CUP<sub>HNSCC</sub> im Vergleich zu anderen KHT nicht gesichert. In der Metaanalyse von Ren et al. 2019 zeigte sich sogar eine etwas geringere HPV-Assoziation unter dem CUP<sub>HNSCC</sub> im Vergleich zu OPSCC jeweils gleicher Institutionen. Beim Vergleich von CUP-Studien sollte auf eine sorgfältige Überprüfung der Vergleichbarkeit des Studiendesigns geachtet werden, insbesondere im Hinblick auf den Umgang mit im Verlauf detektieren Primärtumoren, da dies die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen kann.

### **4.3 Tumorcharakteristika von CUP<sub>HNSCC</sub> im Vergleich zu KHT**

Allgemein handelt es sich beim CUP-Syndrom aus histopathologischer Sicht nur in 5-8% der Fälle um die Entität eines Plattenepithelkarzinoms (Robert Koch Institut 2019). Beim CUP-Syndrom im Kopf-Halsbereich handelt es sich hingegen in etwa 70-80% der Fälle

um Plattenepithelkarzinome (Sanderson und Ironside 2002; Zhuang et al. 2014). Es ist daher wahrscheinlich, dass derartige zervikalen Metastasen des CUP<sub>HNSCC</sub> aus Plattenepithelzellen im Kopf-Hals-Bereich entstehen. So erklärt sich, dass CUPs ähnliche Eigenschaften zeigen wie andere Tumore der entsprechenden Lokalisation. Die Entität des Plattenepithelkarzinoms hat einen Anteil von etwa 90% bei den KHT (Wittekind et al. 2001). Ähnliches zeigt sich zum Beispiel auch bei den Risikofaktoren Nikotin und Alkohol (3.3.4) oder bei der Geschlechterverteilung. Beim CUP-Syndrom im Allgemeinen wird eine Geschlechterverteilung von ca. 1:1 beobachtet (Löffler und Krämer 2017). In unserem Kollektiv zeigt sich ein Verhältnis von Männern zu Frauen von 3:1, wie es auch für andere KHT in der Literatur beschrieben wird (Pavlidis und Plataniotis 2016).

Wir führten einen Vergleich verschiedener Zellmarker und Lebensstil-Risikofaktoren der CUP<sub>HNSCC</sub> und OPSCC aus Gießen durch (3.7). Insgesamt zeigen sich, abgesehen von Alkoholabusus und LAG 3-Positivität, keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Insbesondere für die zellulären Biomarker HPV und PD-L1 zeigen sich in den beiden Gruppen ähnliche Verteilungen. Die aufgezeigten ähnlichen Eigenschaften des CUP-Syndroms zu Primärtumoren entsprechender Lokalisation werden auch von weiteren Autoren beschrieben (1.1.3) und bestätigen sich in unserer Kohorte.

### **4.4 Entwicklung der Fallzahlen im zeitlichen Verlauf**

Im Zeitraum von 2001-2016 war eine signifikante Zunahme der CUP<sub>HNSCC</sub> -Fälle in unserem Kollektiv zu verzeichnen (Abbildung 10A). Es ist allerdings zu beachten, dass Ausreißer (wie etwa das Jahr 2011 mit nur einem neuen CUP<sub>HNSCC</sub> -Fall) aufgrund der geringen Fallzahl die Ergebnisse stark beeinflussen. Die Kohorte besteht aus Patienten einer Institution (Universitätsklinikum Gießen), weshalb die in 3.2.3 beschriebenen Veränderungen innerhalb der Abteilung mutmaßlich ursächlich für diese Schwankung der Fallzahlen sind. Zur Verifizierung eines möglichen Trends wurde die Entwicklung für deutschlandweite Fallzahlen untersucht (Abbildung 11). Diese Zahlen beziehen sich jedoch auf alle diagnostizierten CUP-Fälle jeder Lokalisation und Entität, da eine Zuordnung zur Fachabteilung anhand der im Krebsregister hinterlegten Daten nicht möglich ist. Da das CUP-Syndrom i.d.R. Ähnlichkeiten zu anderen Tumoren gleicher Lokalisation aufweist (4.3), wurden zudem die Fallzahlen für KHT betrachtet: Im gleichen Zeitraum (2001-2016) konnte deutschlandweit eine Zunahme der Fallzahlen von

CUP-Fällen sowie der KHT nachgewiesen werden (Abbildung 11). Das CUP<sub>HNSCC</sub> ist eine Teilmenge der CUP-Fälle sowie der KHT. Angesichts des signifikanten Anstiegs der Fallzahlen sowohl des CUP-Syndroms als auch der KHT im zeitlichen Verlauf, liegt nahe, dass die Fallzahlen des CUP<sub>HNSCC</sub> ebenfalls eine solche Entwicklung nehmen könnten. Dies entspricht den Beobachtungen im Gießener CUP<sub>HNSCC</sub>-Kollektiv.

### **4.5 Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>**

In der heterogenen Gruppe des CUP-Syndroms, mit einer durchschnittlichen 5-JÜR von ca. 4% (Brewster et al. 2014), gehört das CUP<sub>HNSCC</sub> zu einer prognostisch günstigen Subgruppe mit einem vergleichsweise guten Gesamtüberleben. Hierbei spielt eine entscheidende Rolle, dass der Tumor häufig durch chirurgische Intervention vollständig entfernt werden kann und so therapierbar ist. Einer Metaanalyse von Zaun et al. 2018 zeigt eine 5-JÜR von 40-60% für das CUP<sub>HNSCC</sub>, was auch der Beobachtung in unserem Kollektiv entspricht (5-JÜR bei 53%). Auch die Studie von Petrakis et al. 2013 ordnet Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> der Gruppe mit der besten Prognose unter Patienten mit CUP-Syndrom zu. Zudem ist der HPV- bzw. der p16<sup>INK4a</sup>-Status bei CUP<sub>HNSCC</sub> von prognostischer und mittlerweile auch therapeutischer Relevanz. Die sehr gute Prognose der HPV-positiven CUP<sub>HNSCC</sub>-Subgruppe trägt mutmaßlich ebenfalls zur guten Gesamtprognose der CUP<sub>HNSCC</sub> bei, im Gegensatz zu anderen CUP-Varianten, bei denen HPV keine bedeutende prognostische Rolle spielt.

#### **4.5.1 Der HPV-Status als Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben und dessen Auswirkungen auf die Therapie**

In der univariaten Überlebensanalyse wurde im Kollektiv dieser Arbeit ein signifikant besseres Gesamtüberleben für Patienten mit HPV-positivem CUP<sub>HNSCC</sub> im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub> festgestellt ( $p < 0,001$ ). Zahlreiche weitere Studien bestätigen diese günstigere Prognose für HPV-assoziierte CUP<sub>HNSCC</sub> (Tabelle 4). Bei KHT ist eine HPV-Assoziation als günstiger Faktor für das Gesamtüberleben anerkannt. Dies zeigt sich in unserem CUP<sub>HNSCC</sub>-Kollektiv, wie auch im OPSCC-Kollektiv aus Gießen und wird in einer internationalen Metaanalyse von O'Rorke et al. verifiziert (Wagner et al. 2016; Wagner et al. 2017; O'Rorke et al. 2012; Wagner et al. 2020).

HPV-positive KHT unterscheiden sich grundlegend von HPV-negativen. Auf molekularer Ebene zeigt sich eine unterschiedliche Onkogenese, daher muss bei nahezu allen bekannten Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, Noxen etc.) der HPV-Status als Einflussfaktor diskutiert werden. Grundsätzlich sollten HPV-positive und -negative KHT als jeweils eigene Entität getrennt betrachtet werden, wie es bereits in der 2017 überarbeiteten 8. TNM-Klassifikation umgesetzt wurde.

Abgesehen von Unterschieden beim Konsum von Alkohol und Nikotin (4.5.2) zeigen sich in der Gruppe der Patienten mit HPV-positiven CUP<sub>HNSCC</sub> signifikant häufiger kleine Tumore (N1-N2b,  $p = 0,012$ ) als bei HPV-negativen. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte das körpereigene Immunsystem sein: Das Virusprotein E5 führt zu verminderter Expression von HLA Klasse I an der Zelloberfläche (Ashrafi et al. 2005), was diese Zellen für NK-Zellen „verdächtig“ macht. NK-Zellen kommen in der Epidermis, in welcher sich der natürliche Reproduktionszyklus von HPV abspielt, nur selten vor. Die virusinduzierten Tumore können abseits der Epidermis jedoch prinzipiell besser von NK-Zellen erkannt werden, worauf publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe und weiterer Autoren hindeuten (Wagner et al. 2016; Bisheshar et al. 2020). Es existieren jedoch weitere Escapemechanismen, welche das Tumorwachstum begünstigen. Diese könnten im Rahmen der Therapie ausgeschaltet werden, was letztendlich zu einer Verbesserung der Prognose der HPV-positiven CUP<sub>HNSCC</sub> führt.

Im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren konnte in Studien ein besseres Ansprechen von HPV-assoziierten Tumoren auf die bisher etablierten (klassischen) Therapiekonzepte nachgewiesen werden, vor allem in Hinblick auf die Radio-(chemo)-therapie (Ziemann et al. 2015; Arenz et al. 2014; Dietz et al. 2021). Studien für eine Radiosensibilisierung – insbesondere für HPV-negative KHT – sind Gegenstand aktueller Forschung (Zech et al. 2022). Angesichts des signifikant besseren Gesamtüberlebens und des besseren Ansprechens auf die Therapie entsteht der Eindruck, dass Patienten mit HPV-positiven KHT generell von einer Deeskalation der Therapie profitieren könnten. Nach aktueller Studienlage scheint einer Deeskalation der Therapie jedoch allenfalls für selektive Gruppen innerhalb der HPV-assoziierten KHT mit vergleichbaren Resultaten zur konventionellen Therapie verbunden zu sein. Bei aktuell fehlenden positiven Phase-3-Studien zur Deeskalation der Standardtherapie sollte außerhalb klinischer Studien davon abgesehen werden (Rühle et al. 2020). Eine Reihe nationaler und internationaler Deintensivierungsstudien ist initiiert bzw. aktuell in Durchführung (z.B. ADEPT,

PATHOS, EORTC-1420). Eine abschließende Bewertung der Therapie-deeskalation bei HPV-assoziierten KHT sollte abgewartet werden (Dietz et al. 2021), jedoch zeigen Daten bereits, dass eine eindeutige Klassifizierung des HPV-Status für derartige Konzepte unerlässlich ist (Wagner et al. 2020).

Es gilt zu beachten, dass die TMN-Klassifikation für p16<sup>INK4a</sup>-positive OPSCC 2017 angepasst wurde. Für den N-Status ist seither nur noch die Anzahl an tumorbefallenen Lymphknoten ausschlaggebend: pN1 = Metastase(n) in  $\leq 4$  Lymphknoten; pN2 = Metastasen in  $> 4$  Lymphknoten. Die Größenausdehnung, Lokalisation und extrakapsuläres Wachstum spielen bei der neuen Einteilung keine Rolle. So kann aus einer nach der vorherigen TNM-Klassifikation als N3 eingeteilten Metastase (eine Metastase  $> 6$ cm) nach neuer Klassifikation ein N1-Status resultieren. Der N-Status ist oftmals wegweisend für die Entscheidung über die Intensität der weiteren Therapie. Bei p16<sup>INK4a</sup>-positiven Fällen sollten daher – auch bei scheinbar „kleinen“ Lymphknotenmetastasen – für die Therapie die genauen Tumorcharakteristika betrachtet werden, um eine indirekte Deeskalation der Therapie aufgrund der geänderten Klassifikation zu vermeiden.

### **4.5.2 Nikotin und Alkohol als Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben**

Nikotin- und Alkoholabusus sind als prognostisch ungünstige Faktoren bei KHT bekannt. Alkohol scheint zum einen durch seine Metaboliten die DNA-Reparaturmechanismen zu stören, zum anderen kann Alkohol als Lösungsmittel für Bestandteile des Tabakrauchs fungieren und so den kanzerogenen Effekt von Nikotin verstärken (Pai und Westra 2009). Nikotin und Alkohol werden im Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland vom RKI und der Deutschen Krebsgesellschaft als Risikofaktoren mit synergistischer Wirkung beschrieben. (ZfKD im Robert Koch-Institut 2016; Deutsche Krebsgesellschaft 2013). Dieser Effekt war auch in unserem Kollektiv nachzuweisen. Patienten mit Nikotin- und Alkoholabusus zeigen das schlechteste Gesamtüberleben, Patienten ohne Noxen das Beste, dazwischen verläuft die Überlebenskurve für Patienten, die nur Nikotin konsumierten (genaueres 3.8.3, Abbildung 21). Bei der separaten Betrachtung der Noxen hatten sowohl Patienten mit Nikotin- als auch Patienten mit Alkoholabusus ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben als Patienten ohne Noxen ( $p = 0,028$ ,  $p = 0,012$ ). Grundsätzlich ist es jedoch kaum möglich, beide Noxen separat zu betrachten, da

insbesondere ein Alkoholabusus bei KHT-Patienten fast immer mit einem Nikotinabusus einhergeht und auch unter den Patienten dieser Arbeit keiner mit ausschließlichem Alkoholabusus zu finden war. So kann von einem synergistischen, negativen Effekt auf das Gesamtüberleben bei Kombination der Noxen Alkohol und Nikotin ausgegangen werden, wie bereits von Wittekindt et al. 2012 beschrieben. Patienten mit HPV-positivem CUP<sub>HNSCC</sub> gaben dagegen signifikant seltener einen Nikotin- oder Alkoholabusus an ( $p = 0,002$ ; 3.3.4). Insbesondere bei der Genese HPV-negativer Tumore scheinen Nikotin- und Alkoholabusus eine bedeutende Rolle zu spielen, sowohl als Kanzerogen, als auch als prognostischer Faktor.

### **4.5.3 Entzündungsparameter, ECOG-Status und Tumorgröße als Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben**

Eine zum Diagnosezeitpunkt laborchemisch nachgewiesene Inflammation (pathologischer CRP-/Leukozytenwert) zeigt sich assoziiert mit einem ungünstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben, insbesondere bei Patienten mit HPV-negativem CUP<sub>HNSCC</sub> (3.8.6). Die Ursache für erhöhte Entzündungswerte ist nicht abschließend geklärt, wird jedoch im Rahmen maligner Krankheitsprozesse häufig beschrieben (Mahmoud und Rivera 2002). Eine Inflammation wurde auch in den Studien von Mohamed et al. 2014, Proctor et al. und Petrakis et. al. 2013 als unabhängiger Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben bei Tumorerkrankung beschrieben. So könnten Entzündungsparameter wie CRP und Leukozyten als Marker für Proliferation und Entwicklung von Tumoren in Betracht kommen. Da es sich bei den o.g. Parametern jedoch um multifaktoriell beeinflusste Laborwerte handelt, ist eine pauschale Zuordnung zu einer Tumorerkrankung nicht möglich. Hierzu bedarf es weiterführender Forschung, um typische Laborkonstellationen bei Tumorerkrankungen und insbesondere deren prognostische Aussagekraft für KHT zu verifizieren.

Weiterhin erwies sich in den beiden o.g. Studien sowie in der Studie von Grau et al. 2000 der ECOG-Status als unabhängiger Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben (Mohamed et al. 2014; Proctor et al. 2011; Petrakis et al. 2013; Grau et al. 2000). Dieser Einfluss wird auch in unserem Kollektiv beobachtet: Patienten mit geringen Einschränkungen im Alltag (ECOG 0-1) zeigen ein signifikant besseres Gesamtüberleben im Vergleich zu pflegebedürftigen Patienten (ECOG 2-4). Der ECOG-Status lässt auf den körperlichen Allgemeinzustand eines Patienten schließen, welcher in vielen prognoserelevanten

Faktoren wie beispielsweise der Ernährungssituation, Versorgungs- und Rehabilitationsmöglichkeiten, Tumorgröße sowie den Therapieoptionen berücksichtigt werden muss. Daher ist der ECOG-Status bei nahezu allen malignen Erkrankungen von Bedeutung und in seiner prognostischen Relevanz wahrscheinlich häufig unterschätzt.

Bei KHT-Patienten kann sowohl der „konsumierende Charakter“ einer malignen Erkrankung als auch eine krankheitsbedingte Dysphagie zur Malnutrition beitragen. Schluck- und Ernährungsstatus bei KHT-Patienten können die onkologische Therapie und Prognose nachhaltig beeinflussen. In der Studien von Tsai et al. ging eine Malnutrition mit signifikant häufigeren postoperativen Komplikationen einher. In der Studie von Chang et al. 2013 zeigte sich der prätherapeutische BMI und somit der Ernährungsstatus als signifikanter prognostischer Parameter für das Gesamtüberleben. Dieser Effekt kann auch im Gießener CUP-Kollektiv beobachtet werden. Um einer Malnutrition vorzubeugen, sollte bei Diagnosestellung ein standardisiertes Screening durchgeführt werden, um gefährdete Patienten frühzeitig zu erkennen. Nur so kann eine bedarfsgerechte Versorgung eingeleitet werden wie beispielsweise die Unterstützung mittels Trinknahrung und – wenn notwendig – auch parenteraler Ernährung oder Sicherung der enteralen Ernährung. Eine begleitende Ernährungsberatung sollte Teil einer jeden modernen onkologischen Therapie sein und scheint prognostisch von großer Bedeutung.

Eine geringe Tumorgröße – also im Falle von CUP<sub>HNSCC</sub> ein niedriger N-Status (N1-N2b) – und das Fehlen von Fernmetastasen zum Diagnosezeitpunkt bzw. im späteren Verlauf gingen mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben einher ( $p < 0,001$ ). Dieser Effekt wurde auch von weiteren Autoren für das CUP<sub>HNSCC</sub> beschrieben (Al Kadah et al. 2017; Hauswald et al. 2008; Grau et al. 2000). Kleine, lokalisierte Tumore können im Gegensatz zu großen Tumoren oder Fernmetastasen chirurgisch häufig vollständig entfernt werden. Kurative Therapiekonzepte werden bei zunehmender Tumorgröße und insbesondere bei Fernmetastasierung schwieriger. Hierbei sollte erwähnt werden, dass für Patienten mit KHT bei Fernmetastasierung i.d.R. keine kurative Therapieoption mehr besteht. Insofern ist das bessere Gesamtüberleben bei kleinen Tumoren bzw. ohne Fernmetastasen nicht weiter verwunderlich. Es verdeutlicht jedoch die Wichtigkeit, CUP<sub>HNSCC</sub> in einem möglichst frühen Stadium zu erkennen und eine entsprechende Therapie unverzüglich einzuleiten.

#### **4.5.4 Die Therapieform als Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben**

Bei der Analyse der verschiedenen Therapieformen im Kollektiv zeigt sich, dass die Durchführung einer Kombination aus Neck-Dissection und Radio- bzw. Radiochemotherapie mit dem besten Gesamtüberleben verbunden war (3.8.5/ Abbildung 23). Diese war einer monomodalen Therapie bzw. der RCT überlegen. Patienten, welche jede Form der Therapie ablehnten, wiesen aufgrund der aggressiven Natur des CUP<sub>HNSCC</sub> erwartungsgemäß das schlechteste Gesamtüberleben auf. Bei den möglichen Therapieoptionen gibt es Hinweise darauf, dass die multimodale Behandlung bessere Ergebnisse liefert, insbesondere bei einer Tumorgröße  $\geq 2b$ . Ein eindeutiger Beleg für einen Überlebensvorteil durch eine Behandlungsintensivierung (erhöhte Strahlendosis/begleitende Chemotherapie) konnte bisher jedoch nicht erbracht werden (Müller von der Grün et al. 2017). Bis heute gibt es keine prospektive Phase-III-Studie zur Optimierung der Behandlung von Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>. Dagegen sind prospektive Studien zur Evaluation und Erweiterung der Therapiekonzepte von KHT Gegenstand aktueller Forschung (Wedekind 2021). Grundsätzlich wird bei der Auswahl des Therapiekonzepts eine Vielzahl an Faktoren der Patienten berücksichtigt (Alter, Situation, Allgemeinzustand, Wunsch des Patienten, etc.). So zeigt sich beispielsweise eine Assoziation zwischen dem ECOG-Status und der Auswahl der Therapie: Gesunde Patienten (ECOG 0-1) wurden signifikant häufiger mit einem multimodalen Therapiekonzept behandelt, während bei kranken Patienten (ECOG 2-4) signifikant häufiger keine oder eine monomodale Therapie eingeleitet wurde ( $p = 0,001$ ). Daher ist trotz der signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben zwischen den verschiedenen Therapiekonzepten (3.8.5) kein kausaler Rückschluss auf die Effektivität der einzelnen Therapiekonzepte möglich. Die o.g. Gründe führen zu Selektionseffekten, welche die Wahl der Therapie sowie die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen. Demzufolge kann die Therapie mit dem besten Gesamtüberleben nicht per se als „die beste Therapie“ bezeichnet werden. Patienten mit einer insgesamt besseren Prognose werden mit Therapiekonzepten behandelt, welche durch die günstige Prognose der Patienten eine hohe Erfolgsquote mit gutem Gesamtüberleben aufweisen. Diese Therapie ist dann augenscheinlich am erfolgversprechendsten, wobei die Patienten unterschiedliche Ausgangschancen aufweisen. Die Anwendung eines Therapiekonzepts ist an situative Einflüsse gebunden und somit ein direkter Vergleich schwierig bzw. nicht

aussagekräftig. Aus diesem Grund wurde die Therapie auch nicht in die multivariaten Analysen (3.9.1) mit einbezogen.

### **4.6 PD-L1 beim CUP<sub>HNSCC</sub> -Syndrom**

Das Membranprotein PD-L1 hat seit der Zulassung von PD-1- bzw. PD-L1-Inhibitoren in der onkologischen Behandlung an Bedeutung gewonnen. Bei der Therapie von Patienten mit KHT konnte ein zusätzlicher Therapieeffekt von PD-1-Inhibitoren für das metastasierte Plattenepithelkarzinom bei Tumorprogression während oder nach platinbasierter Therapie nachgewiesen werden (Cohen et al. 2017; Gillison et al. 2018). Weitere Immuncheckpoint-Inhibitoren als Signalwegmodulatoren zur Tumorthherapie sind Gegenstand aktueller Forschung. Sie gelten als gut verträgliche Therapieergänzung bzw. Alternative gegenüber den etablierten Therapiekonzepten bei palliativer Situation und sind aktuell in ständiger Weiterentwicklung. PD-L1 könnte ein interessanter Biomarker für zukünftige Behandlungsentscheidungen bei Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub> sein, da dieser das Therapieansprechen beeinflussen können. Aktuelle Studien weisen zudem auf eine Modulation der PD-L1-Expression unter einer Radio-(chemo)-therapie hin (Affolter et al.).

Es wurden mehrere Studien zur PD-L1-Expression bei KHT veröffentlicht. Bei alleiniger Betrachtung des PD-L1-Status der Tumorzellen zeigte sich in den Studien von Wuerdemann et al. 2020 (n = 171), Ukpo et al. 2013 (n = 181), Kim et al. 2016 (n = 133) und Yoo et al. 2019 (n = 158) kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben von Patienten mit KHT. In Tabelle 21 sind die Ergebnisse dieser Studien zusammengefasst. Der Anteil der PD-L1-positiven Patienten differiert zwischen 18% und 68%. In unserem Kollektiv weisen 31 von 81 (38%) untersuchten CUP<sub>HNSCC</sub> PD-L1-positive Zellen von mehr als 1% der Tumorfläche auf. Bei der Betrachtung der Tumorrandbereiche zeigen 29 (36%) der Metastasen PD-L1-positive Tumor- und/oder Immunzellen. Der stark schwankende Anteil von PD-L1-positiven Proben zwischen den Studien könnte durch die Verwendung von verschiedenen Antikörpern erklärt werden. Unterschiede bei der Auswertung, wie z.B. verschiedene Cut-off-Werte, sind dadurch nicht auszuschließen. Auch Unterschiede bei den Färbungen aufgrund verschiedener exogener Faktoren sind denkbar, wie sie z.B. in dieser Arbeit bei unterschiedlichem Alter der Schnitte gezeigt werden konnten (3.6.1.1).

**Tabelle 21: Zusammenfassung von Studien zur Expression von PD-L1 bei KHT**

	<b>n</b>	<b>Jahr</b>	<b>Antikörper</b>	<b>PD-L1 +</b>
<b>Ukpo et al</b>	181	2013	A3	46%
<b>Kim et al.</b>	133	2016	5H1	68%
<b>Yoo et. al.</b>	158	2019	E1L3N	65%
<b>Satgunaseelan et al.</b>	217	2016	E1L3N	18%
<b>OPSCC Gießen (Wuerdemann et al.)</b>	171	2017	28-8	41%
<b>CUP<sub>HNSCC</sub> Gießen</b>	81	2019	28-8	38%

In dieser Arbeit kann für eine PD-L1-Expression bei CUP<sub>HNSCC</sub> kein signifikanter Vorteil für das Gesamtüberleben festgestellt werden (Abbildung 25A). In einer Studie an Melanomgewebe zeigt sich, dass die Tumormikroumgebung (TME, *Tumormicroenvironment*) eine wichtige Rolle bei Mechanismen spielt, welche den Tumor vor dem körpereigenen Immunsystem schützen (*Immunescape*) (Mitteldorf et al. 2017). Diese Escape-Mechanismen werden mutmaßlich durch das TME beeinflusst. Mitteldorf et al. konnte eine vermehrte PD-L1-Expression von Immunzellen im Tumorrandbereich bei Melanomen nachweisen. Somit scheint PD-L1 für die Funktion des TME eine Rolle zu spielen. Es wird beschrieben, dass PD-L1-positive Zellen eine Apoptose in PD-1-positiven tumorinfiltrierenden Lymphozyten induzieren können (Azuma et al. 2008). Dies könnte eine Erklärung sein für das in unserer Untersuchung nachgewiesene signifikant bessere Gesamtüberleben bei Patienten mit Tumoren, welche PD-L1 im Tumorrandbereich exprimieren. In der Studie von Wuerdemann et al. zeigt sich ein besseres Gesamtüberleben bei PD-L1-Expression und gleichzeitigem CD8+-Nachweis. Der alleinige Nachweis von PD-L1 scheint aktuell allenfalls von geringer prognostischer Bedeutung. Neue Therapiekonzepte greifen jedoch an diesem Biomarker an. Es sind insgesamt weitere Untersuchungen notwendig, um Subgruppen zu bestimmen, welche – ggf. aufgrund einer bestimmten Konstellation verschiedener Biomarkern und anderer Einflussfaktoren – von einer alternativen Therapie mittels Checkpoint-Inhibitoren profitieren (Wuerdemann et al. 2020).

## 4.7 Weitere Immunbiomarker: LAG 3 und MHC I

Das körpereigene Immunsystem kann Tumorantigene durch die Präsentation kleiner antigener Peptide durch zytotoxische T-Lymphozyten erkennen und den entstehenden Tumor bekämpfen. Allerdings können Tumorzellen diesen Abwehrmechanismen durch spezifische Mutation entgehen. Dabei sind Veränderungen in der Expression der Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle (MHC-Moleküle) in ihrer Funktion bei der Antigenpräsentation gegenüber T-Lymphozyten von großer Bedeutung. Auch die Funktionsregulation der NK-Zellen ist ein entscheidender Schritt in der Tumorentwicklung, welcher durch die MHC-Antigene beeinflusst wird (Garcia-Lora et al. 2003).

Ähnlich wie PD-L1 löst LAG 3 normalerweise (im Gesunden) eine immunsuppressive Reaktion aus und hemmt so überschießende Immunreaktionen, welche u.a. Autoimmunreaktionen verursachen können. Exprimiert ein Tumor LAG 3 kann er sich so vor dem Immunsystem schützen (*Immunescape*). In einer Metaanalyse konnte ein positiver Einfluss der Expression von LAG 3 auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit Tumoren verschiedener Entität nachgewiesen werden (Saleh et al. 2019). Ein solcher Effekt wird auch in unserem Kollektiv beobachtet. Eine Assoziation einer Expression von PD-L1 und LAG 3 mit einem besseren Gesamtüberleben scheint zunächst aufgrund des *Immunescape* paradox. Es wird spekuliert, dass eine Hochregulation dieser Proteine in Tumoren einen negativen Feedbackmechanismus aktiviert, der im Tumorgewebe ein supprimiertes Immunmilieu schafft. In diesem werden Tumorzellen aufgrund deren Expression von PD-L1 und LAG 3 nicht effektiv angegriffen. Unter einer konventionellen Therapie könnte der *Immunescape* durch bisher ungeklärte Ursachen (zumindest zeitweise) aufgehoben oder abgeschwächt werden. So könnte das Immunsystem verstärkt eingreifen und von der Therapie nicht erfasste Tumorzellen angreifen, was schlussendlich zu einem besseren Gesamtüberleben führt. Die molekularen Mechanismen in diesem Zusammenhang sind allerdings bisher unzureichend erforscht und es bedarf weiterer Grundlagenforschung (Saleh et al. 2019).

Ähnlich wie für PD-1 bzw. PD-L1 wird aktuell an Inhibitoren für den Immun-Checkpoint LAG 3 geforscht. Durch die medikamentöse Hemmung von LAG 3 wird eine vermehrte zytotoxische Immunreaktionen in Gang gesetzt, welche letztlich die Elimination des Tumors bewirken soll (Schildhaus 2018). Bei Patienten mit Melanomen hat sich in einer

Studie bereits gezeigt, dass durch die Behandlung mit LAG 3-Inhibitoren in Kombination mit Anti-PD-1 eine verbesserte Wirkung der Medikamente erzielt werden kann als bei deren Einzelgabe (Larkin et al. 2019; Tawbi et al. 2022).

In der Studie von Yoo et al. 2019 zeigt sich ein schlechteres Gesamtüberleben für PD-L1-positive Patienten, welche gleichzeitig negativ auf MHC I getestet wurden. Dieses Zusammenspiel von PD-L1 und MHC I kann in unserem CUP-Kollektiv nicht nachgewiesen werden. Es zeigt sich jedoch ein signifikant besseres Gesamtüberleben für Patienten mit CUP<sub>HNSCC</sub>, welche positiv für die Zellmarker MHC I und/oder LAG 3 waren. Das Zusammenspiel verschiedener Biomarker und Signalwege scheint sowohl im Tumor als auch im TME für die Risikostratifizierung und den Therapieerfolg eine entscheidende Rolle zu spielen. Aufgrund der diskrepanten Ergebnisse bestehender Studien bedarf es jedoch weiterer Forschung, um die Rolle der Biomarker umfänglich zu erfassen und deren Beitrag bei bestimmten Therapiekonzepten besser einordnen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Eine Assoziation der Karzinogenese mit Humanen Papillomaviren (HPV) ist als günstiger Prognosefaktor bei Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithel-CUP ( $CUP_{HNSCC}$ ) bekannt. Weitere Prognoseparameter sind beim  $CUP_{HNSCC}$  bisher nur wenig erforscht. Daher wurden in dieser Arbeit untersucht, inwiefern Biomarker eine prognostische Bedeutung für Patienten mit  $CUP_{HNSCC}$  haben. Insbesondere PD-L1 gewinnt durch den Stellenwert der Checkpoint-Inhibitoren als Tumorthapeutika zunehmend an Bedeutung.

Für die Untersuchung wurden Daten von 104 Patienten mit  $CUP_{HNSCC}$  ausgewertet. Die Daten zu Lebensstil und Risikoprofilen wurden retrospektiv erfasst und analysiert. Es wurde eine HPV-Testung mittels  $p16^{INK4a}$ -IHC und HPV-PCR sowie ergänzend für bestimmte Proben eine RT-PCR für HPV-mRNA durchgeführt. Für die Untersuchung weiterer Biomarker wurden Tissue Microarrays (TMAs) erstellt, welche mittels IHC u.a. für PD-L1, MHC I und LAG 3 untersucht wurden. Es wurden statistisch univariate und multivariate Überlebenszeitanalysen durchgeführt.

31% der Proben zeigten einen positiven HPV-Status, welcher in dieser Arbeit mit dem  $p16^{INK4a}$ -Status gleich ist. Dieser war mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben verbunden. Als weitere Faktoren mit unabhängigem Einfluss auf das Gesamtüberleben konnten der ECOG-Status, die Tumorgröße (N-Status) sowie die MHC I/LAG 3 Expression im Tumorgewebe identifiziert werden. Bei der anteilig größeren Subgruppe der HPV-negativen  $CUP_{HNSCC}$  zeigten folgende Faktoren einen signifikanten, jeweils negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben: Pathologische Leukozyten- CRP- oder Hämatokrit-Werte, Nikotin- und Alkoholabusus, sowie Negativität für die Zellmarker PD-L1 im Tumorrandbereich und LAG 3. Die Expression des MHC I und die Kombination von MHC I/LAG 3 zeigten sich mit einem günstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit HPV-negativem  $CUP_{HNSCC}$  assoziiert.

Die onkologische Therapie wird durch neue Therapeutika und Studienergebnisse immer weiter individuellen Tumor- und Patientencharakteristika angepasst. Der Einfluss verschiedener Biomarker auf die Prognose von Subgruppen, insbesondere unterteilt nach dem HPV-Status, könnte ein vielversprechender Ansatz sein, um das Verständnis der Karzinogenese und somit die Weiterentwicklung individueller Therapiekonzepte voranzutreiben.

## 6 Summary

An association between a positive human papillomavirus (HPV) status is recognized to be a favourable prognostic factor on survival outcomes in patients with head and neck squamous cell carcinoma of unknown primary origin (CUP<sub>HNSCC</sub>). However, limited research has explored further prognostic parameters for CUP<sub>HNSCC</sub>. This study aims to investigate the prognostic significance of biomarkers for patients with CUP<sub>HNSCC</sub>, particularly PD-L1, given the increasing importance of checkpoint inhibitors in cancer treatment.

Data from 104 patients with CUP<sub>HNSCC</sub> were retrospectively analysed, including lifestyle and risk profile information. The HPV status was tested using p16<sup>INK4a</sup>-IHC and HPV-PCR as well as RT-PCR for HPV-mRNA for certain samples. Tissue microarrays (TMAs) were created for the analysis of further biomarkers, which were analysed using IHC for PD-L1, MHC I and LAG 3, among others. Survival time was analysed statistically using univariate and multivariate analyses.

In this study, 31% of the samples showed a positive HPV status, which in this study is the equivalent to a positive p16<sup>INK4a</sup> status and was associated with significantly improved overall survival rates. ECOG status, tumour size (N status) and MHC I/LAG 3 expression in the tumour tissue were identified as further factors with an independent influence on overall survival. In the proportionally larger subgroup of patients with HPV-negative CUP<sub>HNSCC</sub>, several factors significant negatively influenced overall survival, including pathological leukocyte CRP or haematocrit levels, nicotine and alcohol abuse, as well as a negative status for the cell markers PD L1 in the tumour margin and LAG 3. Conversely, the expression of MHC I and the combination of MHC I/LAG 3 were associated with a favourable influence on overall survival in patients with HPV-negative CUP<sub>HNSCC</sub>.

Oncological therapies vary dynamically according to new therapeutic agents and studies, which are increasingly tailored to individual tumour and patient characteristics. The influence of various biomarkers on the prognosis of subgroups, in particular subdivided according to HPV status, could be a promising approach for advancing the understanding of carcinogenesis and thus the further development of individual therapy concepts.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
CDK	cyclinabhängige Kinase
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
CUP	<i>Cancer of unknown primary/</i> Krebserkrankung mit unbekanntem Primärtumor
CUP <sub>HNSCC</sub>	<i>Head and Neck squamous Cell Carcinoma of unknown primary/</i> Plattenepithelkarzinom mit unbekanntem Primärtumor im Kopf-Hals-Bereich
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	<i>Epithelial Growth Factor/</i> Epithelialer Wachstumsfaktor
E2F	Familie von Transkriptionsfaktoren
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
GTDS	Gießener Tumordokumentationssystem
HE	Hämalaun und Eosin
HNO	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
HNSCC	<i>Head and Neck squamous Cell Carcinoma/</i> Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich
<sup>HN</sup> CUP	<i>head-neck-CUP/</i> CUP-Syndrom im Kopf-Hals-Bereich
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Hazard Ratio
i.d.R.	in der Regel
IHC	Immunhistochemie
ISH	in situ-Hydratation
J	Jahr(e)
KHT	Kopf-Hals-Tumor(e)
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LAG 3	<i>Lymphocyte-activation gene 3/</i> Lymphozyten-Aktivierungs-Gen 3

## Abkürzungsverzeichnis

---

MHC	<i>major histocompatibility complex</i> / dt. Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
mmol	Millimol
µm	Mikrometer
ND	Neckdissection
OG	obere Grenze
o.g.	oben genannt(e)
OPSCC	<i>Oropharynx squamosa cell carcinoma</i> / oropharyngeales Plattenepithelkarzinom
p21	Protein und Inhibitor bestimmter CDKs
p53	p-53-Tumorsuppressorprotein
Patient	Patient*innen - Wenn allgemein von "Patienten"/"Patient" die Rede ist, schließt dies alle Geschlechter (m/w/d (LGBTQIA)) ein.
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> /Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	programmed death-ligand 1
PD-1	programmed death receptor 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PY	<i>Packyears</i> (Einheit für den Nikotinkonsum)
Rb (pRb)	Retinoblastomprotein (phosphoryliertes Rb)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SCC	<i>squamous Cell Carcinoma</i> / Plattenepithelkarzinom
SOP	<i>Standard Operation Procedure</i> / Verfahrens-Standard Arbeitsanweisung
TCR	T-Zell Rezeptor
TME	<i>Tumormicroenvironment</i> / Tumormikroumgebung
UG	untere Grenze
VE	vollentsalztes Wasser
Vgl.	vergleiche
VLP	virus like particle
3-/5-JÜR	3-/5-Jahres-Überlebensrate

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zervikale Lymphknotenlevel. ....	6
Abbildung 2: Die Interaktion von E6 und E7 im Zellzyklus. ....	11
Abbildung 3: Der Replikationszyklus von Humanen Papillomaviren (HPV). ....	12
Abbildung 4: Der Signalweg von PD-1/PD-L1 als Beispiel eines Wirkmechanismus von Checkpoint-Inhibitoren. ....	18
Abbildung 5: Mikroskopische Bilder der PD-L1-Färbungen – Antikörper im Vergleich. ....	25
Abbildung 6: Verteilung des N-Status im Untersuchungskollektiv.....	29
Abbildung 7: Gesamtüberleben bei Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> .....	30
Abbildung 8: Zuordnung des HPV-Status. ....	31
Abbildung 9: Gesamtüberleben von Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> in Abhängigkeit vom HPV-DNA- und p16 <sup>INK4a</sup> -Status. ....	32
Abbildung 10: Fallzahlen des CUP <sub>HNSCC</sub> in Gießen. ....	34
Abbildung 11: Inzidenz für das CUP-Syndrom und KHT in Deutschland.....	35
Abbildung 12: Alters- und Geschlechterverteilung bei Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> .....	36
Abbildung 13: Verteilung des Ernährungszustands (BMI) bei Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> . ....	38
Abbildung 14: Risikofaktoren Rauchen und Alkohol bei Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> .....	40
Abbildung 15: Angewendete Therapieoptionen beim CUP <sub>HNSCC</sub> .....	43
Abbildung 16: Einfluss des Alters der Schnitte auf die PD-L1-IHC mit E1L3N-Antikörperklon. ....	47
Abbildung 17: Mikroskopische Bilder der IHC mit PD-L1-Dako-Antikörper.....	48
Abbildung 18: Mikroskopische Bilder der IHC zum Nachweis von MHC I, MHC II und LAG 3.....	50
Abbildung 19: Gesamtüberleben von Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> in Abhängigkeit vom HPV-Status.....	53
Abbildung 20: Einfluss des Allgemein- und Ernährungszustands auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> . ....	55
Abbildung 21: Einfluss von Nikotin- und Alkoholabusus auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> . ....	56
Abbildung 22: Einfluss der Tumorgröße, Fernmetastasierung und des weiteren Erkrankungsverlauf auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> .....	57

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 23: Einfluss der Therapie auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> .....	58
Abbildung 24: Einfluss prognoserelevanter Laborwerte auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> .....	60
Abbildung 25: Einfluss von PD-L1-positiven Tumorzellen (A) bzw. PD-L1-positiven Zellen im Tumorrandbereich (B) auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> .....	61
Abbildung 26: Einfluss von LAG 3, MHC I und MHC II auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUP <sub>HNSCC</sub> .....	62

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lokalisation zervikaler Metastasen mit wahrscheinlicher Lokalisation des Primärtumors.....	6
Tabelle 2: Datenherkunft des CUP-Kollektivs.....	21
Tabelle 3: N-Status bei CUP-Syndrom.....	29
Tabelle 4: Zusammenfassung von Studien zur HPV-Prävalenz bei CUPHNSCC. Modifiziert nach Boscolo-Rizzo et al. 2015.....	33
Tabelle 5: Verteilung des ECOG-Index im Kollektiv nach dem HPV-Status. ....	37
Tabelle 6: Zusammenhang von ECOG und BMI.....	39
Tabelle 7: Übersicht der Biometrie für das gesamte Kollektiv sowie differenziert nach dem HPV-Status.....	40
Tabelle 8 Verteilung des N-Status nach dem HPV-Status im Kollektiv.....	41
Tabelle 9: Zusammenhang von N-Status und Fernmetastasierung bzw. N-Status und Rezidiv. ....	42
Tabelle 10: Durchgeführte Therapien bei CUPHNSCC. ....	43
Tabelle 11: Übersicht der Tumorcharakteristika, Therapie und Krankheitsverlauf für das gesamte Kollektiv sowie differenziert nach dem HPV-Status.....	44
Tabelle 12: Verteilung der Laborwerte von Patienten mit CUPHNSCC.....	45
Tabelle 13: Übersicht der Laborparameter im Rahmen der Tumorrountinediagnostik für das gesamte Kollektiv sowie differenziert nach dem HPV-Status.....	46
Tabelle 14: Zusammenhang von CRP und N-Status.....	46
Tabelle 15: Übersicht der zellulären Biomarker für das gesamte Kollektiv sowie differenziert nach dem HPV-Status.....	51
Tabelle 16: Vergleich CUPHNSCC vs. OPSCC aus Gießen.....	52
Tabelle 17: Einfluss des HPV-Status auf das Gesamtüberleben von Patienten mit CUPHNSCC.....	54
Tabelle 18:Univariate Überlebensanalyse.....	63
Tabelle 19: Multivariate Analyse.....	66
Tabelle 20: Prognostische Faktoren mit Einfluss auf das Gesamtüberleben im Vergleich bei CUPHNSCC mit positivem und negativem HPV-Status. ....	67
Tabelle 21: Zusammenfassung von Studien zur Expression von PD-L1 bei KHT.....	80

## 10 Literaturverzeichnis

Acúrcio, Rita C.; Leonardo-Sousa, Carlota; García-Sosa, Alfonso T.; Salvador, Jorge A.; Florindo, Helena F.; Guedes, Rita C. (2019): Structural insights and binding analysis for determining the molecular bases for programmed cell death protein ligand-1 inhibition. In: *MedChemComm* 10 (10), S. 1810–1818. DOI: 10.1039/c9md00326f.

Affolter, Annette; Liebel, Kai; Seiz, Elena; Azhakesan, Alexya; Ludwig, Sonja; Lammert, Anne et al.: Immun-Checkpointregulation unter Standardtherapie in in vitro und ex vivo HNSCC-Kulturen. In: *Laryngorhinoothologie* 2022, Bd. 101, S. 64.

Ahling, Iris (2017): Prognostische Faktoren in zervikalen Karzinometastasen unbekannter Primärtumoren. Dissertation. Justus Liebig University Gießen. Universitätsbibliothek Gießen.

Al Kadah, Basel; Papaspyrou, Giorgos; Linxweiler, Maximilian; Schick, Bernhard; Rube, Christian; Büchler, Benjamin Simeon; Niewald, Marcus (2017): Cancer of unknown primary (CUP) of the head and neck: retrospective analysis of 81 patients. In: *Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 274 (6), S. 2557–2566. DOI: 10.1007/s00405-017-4525-8.

Ang, K. Kian; Harris, Jonathan; Wheeler, Richard; Weber, Randal; Rosenthal, David I.; Nguyen-Tân, Phuc Felix et al. (2010): Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. In: *The New England journal of medicine* 363 (1), S. 24–35. DOI: 10.1056/NEJMoa0912217.

Arenz, Andrea; Ziemann, Frank; Mayer, Christina; Wittig, Andrea; Dreffke, Kirstin; Preising, Stefanie et al. (2014): Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. In: *Strahlentherapie und Onkologie* 190 (9), S. 839–846. DOI: 10.1007/s00066-014-0605-5.

Arolt, Christoph; Meyer, Moritz; Ruesseler, Vanessa; Nachtsheim, Lisa; Wuerdemann, Nora; Dreyer, Thomas et al. (2020): Lymphocyte activation gene 3 (LAG3) protein expression on tumor-infiltrating lymphocytes in aggressive and TP53-mutated salivary gland carcinomas. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy* 69 (7), S. 1363–1373. DOI: 10.1007/s00262-020-02551-6.

Ashrafi, G. Hossein; Haghshenas, Mohammad R.; Marchetti, Barbara; O'Brien, Philippa M.; Campo, M. Saveria (2005): E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. In: *International journal of cancer* 113 (2), S. 276–283. DOI: 10.1002/ijc.20558.

Azuma, Takeshi; Yao, Sheng; Zhu, Gefeng; Flies, Andrew S.; Flies, Sarah J.; Chen, Lieping (2008): B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. In: *Blood* 111 (7), S. 3635–3643. DOI: 10.1182/blood-2007-11-123141.

Begum, Shahnaz; Cao, Dengfeng; Gillison, Maura; Zahurak, Marianna; Westra, William H. (2005): Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. In: *Clinical cancer research* 11 (16), S. 5694–5699. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0587.

Bisheshar, Sangeeta K.; Ruitter, Emma J. de; Devriese, Lot A.; Willems, Stefan M. (2020): The prognostic role of NK cells and their ligands in squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. In: *Oncoimmunology* 9 (1). DOI: 10.1080/2162402X.2020.1747345.

Bochtler, Tilmann; Pouyiourou, Maria; Krämer, Alwin (2023): CUP-Syndrom – die neue ESMO-Leitlinie. In: *Die Radiologie* 63 (5), S. 329–335. DOI: 10.1007/s00117-023-01126-7.

Boscolo-Rizzo, Paolo; Schroeder, Lea; Romeo, Salvatore; Pawlita, Michael (2015): The prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of unknown primary site metastatic to neck lymph nodes: a systematic review. In: *Clinical & experimental metastasis* 32 (8), S. 835–845. DOI: 10.1007/s10585-015-9744-z.

Brewster, David H.; Lang, Jaroslaw; Bhatti, Lesley A.; Thomson, Catherine S.; Oien, Karin A. (2014): Descriptive epidemiology of cancer of unknown primary site in Scotland, 1961-2010. In: *Cancer epidemiology* 38 (3), S. 227–234. DOI: 10.1016/j.canep.2014.03.010.

Buysse, Laurence; Klug, Stefanie J. (2017): Humane Papillomviren. In: *Gynäkologe* 50 (9), S. 660–664. DOI: 10.1007/s00129-017-4090-7.

Chang, Pei-Hung; Yeh, Kun-Yun; Huang, Jen-Seng; Lai, Chien-Hong; Wu, Tsung-Han; Lan, Yii-Jenq et al. (2013): Pretreatment performance status and nutrition are associated with early mortality of locally advanced head and neck cancer patients undergoing

concurrent chemoradiation. In: *Oto-Rhino-Laryngology* 270 (6), S. 1909–1915. DOI: 10.1007/s00405-012-2290-2.

Cianchetti, Marco; Mancuso, Anthony A.; Amdur, Robert J.; Werning, John W.; Kirwan, Jessica; Morris, Christopher G.; Mendenhall, William M. (2009): Diagnostic evaluation of squamous cell carcinoma metastatic to cervical lymph nodes from an unknown head and neck primary site. In: *The Laryngoscope* 119 (12), S. 2348–2354. DOI: 10.1002/lary.20638.

Cohen, Ezra E.; Harrington, Kevin J.; Le Tourneau, Christophe; Dinis, Jose; Licitra, Lisa; Ahn, Myung-Ju et al. (2017): Pembrolizumab (pembro) vs standard of care (SOC) for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC): Phase 3 KEYNOTE-040 trial. In: *Annals of Oncology* 28, v628. DOI: 10.1093/annonc/mdx440.040.

Davis, Kara S.; Byrd, J. Kenneth; Mehta, Vikas; Chiosea, Simon I.; Kim, Seungwon; Ferris, Robert L. et al. (2014): Occult Primary Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Utility of Discovering Primary Lesions. In: *Otolaryngology--head and neck surgery* 151 (2), S. 272–278. DOI: 10.1177/0194599814533494.

Deutsche Krebsgesellschaft (2013): Risiko und Ursache von Kopf-Hals-Tumoren | DKG. Unter Mitarbeit von Andreas Dietz und Ulrich Keilholz. Online verfügbar unter <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/kopf-hals-tumoren/ursachen-und-risikofaktoren.html>, zuletzt aktualisiert am 16.10.2013.

Dietz, Andreas; Wichmann, Gunnar; Wiegand, Susanne (2021): Update zur Therapie des HPV-16-positiven Oropharynxkarzinoms. In: *Laryngorhinootologie* 100 (10), S. 832–844. DOI: 10.1055/a-1523-9045.

DIMDI (2019): ICD-10-WHO Version 2019. Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information. Online verfügbar unter <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-who/kode-suche/htmlamtl2019/block-c76-c80.htm>, zuletzt aktualisiert am 24.08.2018.

Doorbar, John (2013): The E4 protein; structure, function and patterns of expression. In: *Virology* 445 (1-2), S. 80–98. DOI: 10.1016/j.virol.2013.07.008.

Erkal, Haldun Ş.; Mendenhall, William M.; Amdur, Robert J.; Villaret, Douglas B.; Stringer, Scott P. (2001): Squamous cell carcinomas metastatic to cervical lymph nodes from an unknown head and neck mucosal site treated with radiation therapy with palliative intent. In: *Radiotherapy and Oncology* 59 (3), S. 319–321. DOI: 10.1016/S0167-8140(01)00282-1.

European Medicines Agency (o. J.): Arzneimittelzulassung EU. Online verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>, zuletzt geprüft am 28.02.2022.

Garcia-Lora, Angel; Algarra, Ignacio; Garrido, Federico (2003): MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. In: *Journal of cellular physiology* 195 (3), S. 346–355. DOI: 10.1002/jcp.10290.

Gewin, Lindy; Myers, Hadley; Kiyono, Tohru; Galloway, Denise A. (2004): Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. In: *Genes & Development* 18 (18), S. 2269–2282. DOI: 10.1101/gad.1214704.

Gillison, Maura L.; Blumenschein, George; Fayette, Jerome; Guigay, Joel; Colevas, A. Dimitrios; Licitra, Lisa et al. (2018): CheckMate 141: 1-Year Update and Subgroup Analysis of Nivolumab as First-Line Therapy in Patients with Recurrent/Metastatic Head and Neck Cancer. In: *The oncologist* 23 (9), S. 1079–1082. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0674.

Grau, Cai; Johansen, Lars Vendelbo; Jakobsen, John; Geertsen, Poul; Andersen, Elo; Jensen, Brita Bjerregaard (2000): Cervical lymph node metastases from unknown primary tumours. In: *Radiotherapy and Oncology* 55 (2), S. 121–129. DOI: 10.1016/S0167-8140(00)00172-9.

Gross, Gerd; Becker, Natalia; Brockmeyer, Norbert H.; Esser, Stefan; Freitag, Ulrich; Gebhardt, Marion et al. (2020): Evidenz- und konsensbasierte Leitlinie (S3) - Impfprävention HPV-assoziiierter Neoplasien. In: *AWMF online*. Online verfügbar unter <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/082-002>, zuletzt geprüft am 06.12.2023.

Halec, Gordana; Schmitt, Markus; Dondog, Bolormaa; Sharkhuu, Enkhtuya; Wentzensen, Nicolas; Gheit, Tarik et al. (2013): Biological activity of probable/possible high-risk human papillomavirus types in cervical cancer. In: *International journal of cancer* 132 (1), S. 63–71. DOI: 10.1002/ijc.27605.

Harrington, Kevin J.; Ferris, Robert L.; Blumenschein, George; Colevas, A. Dimitrios; Fayette, Jérôme; Licitra, Lisa et al. (2017): Nivolumab versus standard, single-agent therapy of investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (CheckMate 141): health-related quality-of-life results from a randomised, phase 3 trial. In: *The Lancet Oncology* 18 (8), S. 1104–1115. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30421-7.

Hauswald, Henrik; Lindel, Katja; Rochet, Nathalie; Debus, Juergen; Harms, Wolfgang (2008): Surgery with complete resection improves survival in radiooncologically treated patients with cervical lymph node metastases from cancer of unknown primary. In: *Otolaryngology--head and neck surgery* 184 (3), S. 150–156. DOI: 10.1007/s00066-008-1765-y.

Heinzerling, Lucie; Toni, Enrico N. de; Schett, Georg; Hundorfean, Gheorghe; Zimmer, Lisa (2019): Checkpoint Inhibitors. In: *Deutsches Ärzteblatt international* 116 (8), S. 119–126. DOI: 10.3238/arztebl.2019.0119.

Helbig, Doris; Ihle, Michaela Angelika; Pütz, Katharina; Tantcheva-Poor, Iliana; Mauch, Cornelia; Büttner, Reinhard; Quaas, Alexander (2016): Oncogene and therapeutic target analyses in atypical fibroxanthomas and pleomorphic dermal sarcomas. In: *Oncotarget* 7 (16), S. 21763–21774. DOI: 10.18632/oncotarget.7845.

Hemmat, Nima; Baghi, Hossein Bannazadeh (2018): Human papillomavirus E5 protein, the undercover culprit of tumorigenesis. In: *Infectious agents and cancer* 13, S. 31. DOI: 10.1186/s13027-018-0208-3.

Homann, Nils (2000): Alkohol und Krebs. In: *Therapeutische Umschau* 57 (4), S. 236–240. DOI: 10.1024/0040-5930.57.4.236.

Hübner, Gerdt; Bochtler, Tilmann; Borner, Markus; Stöger, Herbert; Neben, Kai; Ernst, Thomas et al. (2023): CUP Syndrom - Krebserkrankungen mit unbekanntem Primärtumor. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. Hg. v. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und, zuletzt aktualisiert am 06/2023.

IARC (2007): Human papillomaviruses. In: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - International Agency for Research on Cancer der World Health Organisation* 90, S. 47–86.

International Human Papillomavirus Reference Center (o.J.). Online verfügbar unter <https://www.hpvcenter.se/>, zuletzt geprüft am 13.02.2020.

Jensen, David Hebbelstrup; Hedback, Nora; Specht, Lena; Høgdall, Estrid; Andersen, Elo; Therkildsen, Marianne Hamilton et al. (2014): Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma of unknown primary is a common event and a strong predictor of survival. In: *PloS one* 9 (11), e110456. DOI: 10.1371/journal.pone.0110456.

Jereczek-Fossa, Barbara A.; Jassem, Jacek; Orecchia, Roberto (2004): Cervical lymph node metastases of squamous cell carcinoma from an unknown primary. In: *Cancer treatment reviews* 30 (2), S. 153–164. DOI: 10.1016/j.ctrv.2003.10.001.

Johansson, Cecilia; Somberg, Monika; Li, Xiaoze; Backström Winquist, Ellenor; Fay, Joanna; Ryan, Fergus et al. (2012): HPV-16 E2 contributes to induction of HPV-16 late gene expression by inhibiting early polyadenylation. In: *The EMBO journal* 31 (14), S. 3212–3227. DOI: 10.1038/emboj.2012.147.

Kasper, Stefan; Hussain, Timon; Virchow, Isabel; Stuschke, Martin; Lang, Stephan (2019): Immunonkologie von Kopf-Hals-Tumoren. In: *HNO* 67 (3), S. 221–235. DOI: 10.1007/s00106-018-0602-6.

Keir, Mary E.; Butte, Manish J.; Freeman, Gordon J.; Sharpe, Arlene H. (2008): PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. In: *Annual review of immunology* 26, S. 677–704. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.

Kim, Hae Su; Lee, Ji Yun; Lim, Sung Hee; Park, Keunchil; Sun, Jong-Mu; Ko, Young Hye et al. (2016): Association Between PD-L1 and HPV Status and the Prognostic Value of PD-L1 in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. In: *Cancer research and treatment* 48 (2), S. 527–536. DOI: 10.4143/crt.2015.249.

Kirnbauer, Reinhard; Taub, J. V.; Greenstone, Heather; Roden, Richard; Dürst, Matthias; Gissmann, Lutz et al. (1993): Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. In: *Journal of Virology* 67 (12), S. 6929–6936.

Klaes, Ruediger; Friedrich, Tibor; Spitkovsky, Dimitry; Ridder, Ruediger; Rudy, Wolfgang; Petry, K. Ulrich et al. (2001): Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. In: *International journal of cancer* 92 (2), S. 276–284. DOI: 10.1002/ijc.1174.

Kleinsorge, Friedrich; Schmidmayr, Monika (2018): Humane Papillomavirusinfektion bei Frauen : Diagnostik, Therapie und Bedeutung der Impfung. In: *Der Urologe. Ausg. A* 57 (12), S. 1445–1451. DOI: 10.1007/s00120-018-0795-z.

Klussmann, Jens P.; Gültekin, Elif; Weissenborn, Soenke J.; Wieland, Ulrike; Dries, Volker; Dienes, Hans P. et al. (2003): Expression of p16 Protein Identifies a Distinct Entity of Tonsillar Carcinomas Associated with Human Papillomavirus. In: *The American Journal of Pathology* 162 (3), S. 747–753. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63871-0.

Krämer, Alwin; Löffler, Harald (2016): Cancer of unknown Primary. Diagnostic Work-up of CUP: An Approach to Current Recommendations and Underlying Evidence. Cham: Springer.

Kraywinkel, Klaus; Zeissig, Sylke Ruth (2017): Epidemiologie des CUP-Syndroms in Deutschland. In: *Der Onkologe* 23 (12), S. 966–973. DOI: 10.1007/s00761-017-0301-z.

Larkin, James; Chiarion-Sileni, Vanna; Gonzalez, Rene; Grob, Jean-Jacques; Rutkowski, Piotr; Lao, Christopher D. et al. (2019): Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. In: *The New England journal of medicine* 381 (16), S. 1535–1546. DOI: 10.1056/NEJMoa1910836.

Löffler, Harald; Krämer, Alwin (2016): Biologic Features of CUP. In: Alwin Krämer und Harald Löffler (Hg.): *Cancer of Unknown Primary*, Bd. 100. Cham: Springer International Publishing, S. 27–44.

Löffler, Harald; Krämer, Alwin (2017): Prognostisch günstige Subgruppen bei Krebs mit unklarem Primarius. In: *Onkologe* 23 (12), S. 993–999. DOI: 10.1007/s00761-017-0241-7.

Mahmoud, Fade Aziz; Rivera, Nilo I. (2002): The role of C-reactive protein as a prognostic indicator in advanced cancer. In: *Current Oncology Reports* 4 (3), S. 250–255. DOI: 10.1007/s11912-002-0023-1.

Mitteldorf, Christina; Berisha, Arbeneshe; Tronnier, Michael; Pfaltz, Monique C.; Kempf, Werner (2017): PD-1 and PD-L1 in neoplastic cells and the tumor microenvironment of Merkel cell carcinoma. In: *Journal of cutaneous pathology* 44 (9), S. 740–746. DOI: 10.1111/cup.12973.

Mohamed, Zulqarnai; Pinato, David J.; Mauri, Francisco A.; Chen, Kai-Wen; Chang, PaoShu M-H; Sharma, Rohini (2014): Inflammation as a validated prognostic determinant in carcinoma of unknown primary site. In: *British journal of cancer* 110 (1), S. 208–213. DOI: 10.1038/bjc.2013.683.

Mollenhauer, Martin; Assmann, Gerald; Zengel, Pamela; Guntinas-Lichius, Orlando; Ihrler, Stephan (2014): HPV-assozierte oropharyngeale Karzinome. Aktueller Stand und Verhältnis zum Karzinom unbekannter Herkunft. In: *Der Pathologe* 35 (2), 127-40; quiz 141-2. DOI: 10.1007/s00292-013-1852-4.

Mozet, C.; Wichmann, G.; Stumpp, P.; Dietzsch, S.; Dietz, A. (2013): Zervikales CUP-Syndrom. In: *Der Onkologe* 19 (1), S. 44–51. DOI: 10.1007/s00761-012-2315-x.

Müller von der Grün, Jens; Tahtali, Aykut; Ghanaati, Shahram; Rödel, Claus; Balermipas, Panagiotis (2017): Diagnostic and treatment modalities for patients with cervical lymph node metastases of unknown primary site – current status and challenges. In: *Radiation Oncology* 12. DOI: 10.1186/s13014-017-0817-9.

Münger, Karl; Howley, Peter M. (2002): Human papillomavirus immortalization and transformation functions. In: *Virus Research* 89 (2), S. 213–228. DOI: 10.1016/S0168-1702(02)00190-9.

Nishimura, Hiroyuki; Nose, Masato; Hiai, Hiroshi; Minato, Nagahiro; Honjo, Tasuku (1999): Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. In: *Immunity* 11 (2), S. 141–151. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80089-8.

NobelPrize.org: Tasuku Honjo – Facts – 2018. Online verfügbar unter <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/honjo/facts/>, zuletzt geprüft am 28.02.2020.

Oken, M. M.; Creech, R. H.; Tormey, D. C.; Horton, J.; Davis, T. E.; McFadden, E. T.; Carbone, P. P. (1982): Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. In: *American journal of clinical oncology* 5 (6), S. 649–655.

O'Rorke, Michael A.; Ellison, Michael V.; Murray, Lim J.; Moran, Michael; James, Jacqueline; Anderson, Lesley A. (2012): Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. In: *Oral oncology* 48 (12), S. 1191–1201. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.06.019.

Pai, Sara I.; Westra, William H. (2009): Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. In: *Annual review of pathology* 4, S. 49–70. DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158.

Pavletich, N. P. (1999): Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. In: *Journal of molecular biology* 287 (5), S. 821–828. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2640.

Pavlidis, Nicholas; Pentheroudakis, George; Plataniotis, George (2009): Cervical lymph node metastases of squamous cell carcinoma from an unknown primary site: a favourable prognosis subset of patients with CUP. In: *Clinical & translational oncology* 11 (6), S. 340–348. DOI: 10.1007/s12094-009-0367-1.

Pavlidis, Nicholas; Plataniotis, Georgios (2016): Cervical Lymph Node Metastases of Squamous Cell Carcinoma from an Unknown Primary Site. In: Jacques Bernier (Hg.): *Head and Neck Cancer*, Bd. 39. 2. Aufl. Cham: Springer International Publishing, S. 665–672.

Perri, Francesco; Ionna, Franco; Longo, Francesco; Della Vittoria Scarpati, Giuseppina; Angelis, Carmine de; Ottaiano, Alessandro et al. (2020): Immune Response Against Head and Neck Cancer: Biological Mechanisms and Implication on Therapy. In: *Translational oncology* 13 (2), S. 262–274. DOI: 10.1016/j.tranon.2019.11.008.

Petrakis, Dimitrios; Pentheroudakis, George; Voulgaris, Evangelos; Pavlidis, Nicholas (2013): Prognostication in cancer of unknown primary (CUP): development of a prognostic algorithm in 311 cases and review of the literature. In: *Cancer treatment reviews* 39 (7), S. 701–708. DOI: 10.1016/j.ctrv.2013.03.001.

Prigge, Elena-Sophie; Arbyn, Marc; Knebel Doeberitz, Magnus von; Reuschenbach, Miriam (2017): Diagnostic accuracy of p16INK4a immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. In: *International journal of cancer* 140 (5), S. 1186–1198. DOI: 10.1002/ijc.30516.

Prigge, Elena-Sophie; Toth, Csaba; Dyckhoff, Gerhard; Wagner, Steffen; Müller, Franziska; Wittekindt, Claus et al. (2015): p16(INK4a) /Ki-67 co-expression specifically identifies transformed cells in the head and neck region. In: *International journal of cancer* 136 (7), S. 1589–1599. DOI: 10.1002/ijc.29130.

Proctor, Michael J.; Morrison, David S.; Talwar, Dinesh; Balmer, Steven M.; Fletcher, Colin D.; O'Reilly, Denis St J. et al. (2011): A comparison of inflammation-based prognostic scores in patients with cancer. A Glasgow Inflammation Outcome Study. In: *European journal of cancer* 47 (17), S. 2633–2641. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.03.028.

Raghav, Kanwal; Varadhachary, Gauri R. (2016): Favorable Subsets Among Cancers of Unknown Primary. In: Alwin Krämer und Harald Löffler (Hg.): *Cancer of Unknown Primary*, Bd. 371. Cham: Springer International Publishing, S. 151–172.

Reimers, Niklas; Kasper, Hans U.; Weissenborn, Soenke J.; Stützer, Hartmut; Preuss, Simon F.; Hoffmann, Thomas K. et al. (2007): Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. In: *International journal of cancer* 120 (8), S. 1731–1738. DOI: 10.1002/ijc.22355.

Ren, Jianjun; Yang, Wen; Su, Jie; Ren, Xue; Fazelzad, Rouhi; Albert, Tiong et al. (2019): Human papillomavirus and p16 immunostaining, prevalence and prognosis of squamous carcinoma of unknown primary in the head and neck region. In: *International journal of cancer* 145 (6), S. 1465–1474. DOI: 10.1002/ijc.32164.

Ricci-López, Joel; Vidal-Limon, Abraham; Zunñiga, Matías; Jimènez, Verónica A.; Alderete, Joel B.; Brizuela, Carlos A.; Aguila, Sergio (2019): Molecular modeling simulation studies reveal new potential inhibitors against HPV E6 protein. In: *PloS one* 14 (3), e0213028. DOI: 10.1371/journal.pone.0213028.

Robbins, K. Thomas; Clayman, Garry; Levine, Paul A.; Medina, Jesus; Sessions, Roy; Shaha, Ashok et al. (2002): Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. In: *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 128 (7), S. 751–758. DOI: 10.1001/archotol.128.7.751.

Robert Koch Institut (2019): *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 12. Ausgabe. Unter Mitarbeit von Robert Koch Institut (Hg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hg.). Berlin.

Robert Koch-Institut (2018): RKI-Ratgeber Humane Papillomviren. In: *Epidemiologischer Bulletin* (27), S. 255–262. DOI: 10.17886/EpiBull-2018-033.

Rühle, Alexander.; Knopf, Andreas.; Nicolay, Nils. H. (2020): Deeskalation der multimodalen Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen. In: *best practice onkologie* 15 (9), S. 346–361. DOI: 10.1007/s11654-020-00242-3.

Saleh, Ramy R.; Peinado, Paloma; Fuentes-Antrás, Jesús; Pérez-Segura, Pedro; Pandiella, Atanasio; Amir, Eitan; Ocaña, Alberto (2019): Prognostic Value of Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG3) in Cancer: A Meta-Analysis. In: *Frontiers in oncology* 9, S. 1040. DOI: 10.3389/fonc.2019.01040.

Sanderson, Russell J.; Ironside, J. A. D. (2002): Squamous cell carcinomas of the head and neck. In: *BMJ (British Medical Journal)* 325 (7368), S. 822–827. DOI: 10.1136/bmj.325.7368.822.

Satgunaseelan, Laveniya; Gupta, Ruta; Madore, Jason; Chia, Noel; Lum, Trina; Palme, Carsten E. et al. (2016): Programmed cell death-ligand 1 expression in oral squamous cell carcinoma is associated with an inflammatory phenotype. In: *Pathology* 48 (6), S. 574–580. DOI: 10.1016/j.pathol.2016.07.003.

Schildhaus, Hans-Ulrich (2018): Der prädiktive Wert der PD-L1-Diagnostik. In: *Der Pathologe* 39 (6), S. 498–519. DOI: 10.1007/s00292-018-0507-x.

Schroeder, Lea (2017): Human Papillomavirus-Driven Neck Lymph Node Metastases from Oropharyngeal or Unknown Primary Squamous Cell Carcinoma. Dissertation. Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany.

Serrano, M.; Hannon, G. J.; Beach, D. (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. In: *Nature* 366 (6456), S. 704–707. DOI: 10.1038/366704a0.

Serrano, Manuel (1997): The tumor suppressor protein p16INK4a. In: *Experimental cell research* 237 (1), S. 7–13. DOI: 10.1006/excr.1997.3824.

Sivars, Lars; Näsman, Anders; Tertipis, Nikolaos; Vlastos, Andrea; Ramqvist, Torbjörn; Dalianis, Tina et al. (2014): Human papillomavirus and p53 expression in cancer of unknown primary in the head and neck region in relation to clinical outcome. In: *Cancer medicine* 3 (2), S. 376–384. DOI: 10.1002/cam4.199.

Som, Peter M.; Curtin, Hugh D.; Mancuso, Anthony A. (1999): An imaging-based classification for the cervical nodes designed as an adjunct to recent clinically based nodal

classifications. In: *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 125 (4), S. 388–396. DOI: 10.1001/archotol.125.4.388.

Strumberg, Dirk.; Sandler, Andreas.; Adamietz, Irenäus A. (2007): Carcinoma of unknown primary (CUP-Syndrom). In: *Der Onkologe* 13 (7), S. 645–654. DOI: 10.1007/s00761-007-1220-1.

Tawbi, Hussein A.; Schadendorf, Dirk; Lipson, Evan J.; Ascierto, Paolo A.; Matamala, Luis; Castillo Gutiérrez, Erika et al. (2022): Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. In: *The New England journal of medicine* 386 (1), S. 24–34. DOI: 10.1056/NEJMoa2109970.

Tribius, Silke; Hoffmann, Anna S.; Bastrop, Sophie; Görögh, Tibor; Haag, Jochen; Röcken, Christoph et al. (2012): HPV status in patients with head and neck of carcinoma of unknown primary site: HPV, tobacco smoking, and outcome. In: *Oral oncology* 48 (11), S. 1178–1184. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.05.022.

Tsai, Yao-Te; Lai, Chia-Hsuan; Huang, Tzu-Hao; Hsieh, Ching-Chuan; Huang, Ethan I.; Lee, Yi-Chan et al. (2020): Association of malnutrition with postoperative complication risk after curative surgery for oral cancer: Observational study. In: *Medicine* 99 (52), e23860. DOI: 10.1097/MD.00000000000023860.

Urban, Damien; Rao, Aparna; Bressel, Mathias; Lawrence, Yaacov R.; Mileschkin, Linda (2013): Cancer of unknown primary: a population-based analysis of temporal change and socioeconomic disparities. In: *British journal of cancer* 109 (5), S. 1318–1324. DOI: 10.1038/bjc.2013.386.

van Wilson, G.; West, Michael; Woytek, Kelly; Rangasamy, Dandapani (2002): Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. In: *Virus genes* 24 (3), S. 275–290. DOI: 10.1023/a:1015336817836.

Vent, Julia; Haidle, Bastian; Wedemeyer, Inga; Huebbers, Christian; Siefer, Oliver; Semrau, Robert et al. (2013): p16 expression in carcinoma of unknown primary: diagnostic indicator and prognostic marker. In: *Head & neck* 35 (11), S. 1521–1526. DOI: 10.1002/hed.23190.

Villiers, Ethel-Michele de (2013): Cross-roads in the classification of papillomaviruses. In: *Virology* 445 (1-2), S. 2–10. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.023.

Villiers, Ethel-Michele de; Fauquet, Claude; Broker, Thomas R.; Bernard, Hans-Ulrich; zur Hausen, Harald (2004): Classification of papillomaviruses. In: *Virology* 324 (1), S. 17–27. DOI: 10.1016/j.virol.2004.03.033.

Wagner, Steffen; Böckmann, Hendrik; Gattenlöhner, Stefan; Klussmann, Jens P.; Wittekindt, Claus (2018): Das angeborene Immunsystem beim Oropharynxkarzinom: Immunmodulation durch HPV. In: *HNO* 66 (4), S. 301–307. DOI: 10.1007/s00106-018-0480-y.

Wagner, Steffen; Langer, Christine; Wuerdemann, Nora; Reiser, Susanne; Abing, Helen; Pons-Kühnemann, Jörn et al. (2023): Predictors for Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of Unknown Primary in the Head and Neck Region. In: *Cancers* 15, 2167. DOI: 10.3390/cancers15072167.

Wagner, Steffen; Prigge, Elena S.; Wuerdemann, Nora; Reder, Henrike; Bushnak, Ayman; Sharma, S. Jenny et al. (2020): Evaluation of p16 INK4a expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers for treatment de-escalation. In: *British journal of cancer*. DOI: 10.1038/s41416-020-0964-x.

Wagner, Steffen; Wittekindt, Claus; Reuschenbach, Miriam; Hennig, Ben; Thevarajah, Mauran; Würdemann, Nora et al. (2016): CD56-positive lymphocyte infiltration in relation to human papillomavirus association and prognostic significance in oropharyngeal squamous cell carcinoma. In: *International journal of cancer* 138 (9), S. 2263–2273. DOI: 10.1002/ijc.29962.

Wagner, Steffen; Wittekindt, Claus; Sharma, Shachi Jenny; Wuerdemann, Nora; Jüttner, Theresa; Reuschenbach, Miriam et al. (2017): Human papillomavirus association is the most important predictor for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. In: *British journal of cancer* 116 (12), S. 1604–1611. DOI: 10.1038/bjc.2017.132.

Wang, Joshua W.; Roden, Richard B. S. (2013): L2, the minor capsid protein of papillomavirus. In: *Virology* 445 (1-2), S. 175–186. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.017.

Wang, Xin; Teng, Feifei; Kong, Li; Yu, Jinming (2016): PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. In: *OncoTargets and therapy* 9, S. 5023–5039. DOI: 10.2147/OTT.S105862.

Wedekind, Silke (2021): Behandlungsstandards und neue Therapieansätze bei Kopf-Hals-Tumoren. In: *Im Fokus Onkologie* 24 (6), S. 21. DOI: 10.1007/s15015-021-3696-8.

Weiss, Daniel; Koopmann, Mario; Rudack, Claudia (2011): Prevalence and impact on clinicopathological characteristics of human papillomavirus-16 DNA in cervical lymph node metastases of head and neck squamous cell carcinoma. In: *Head & neck* 33 (6), S. 856–862. DOI: 10.1002/hed.21548.

Westra, William H. (2014): Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: Evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. In: *Oral oncology* 50 (9), S. 771–779. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.05.004.

WHO 2020: Alcohol and cancer in the WHO European Region: an appeal for better prevention. Copenhagen: WHO Alcohol and cancer in the WHO European Region: an appeal for better prevention. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2020. Online verfügbar unter <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/336595/WHO-EURO-2020-1435-41185-56004-eng.pdf?sequence=1>.

Wittekind, Christian (Hg.) (2010): TNM. Klassifikation maligner Tumoren. International Union against Cancer. 7. Aufl. Somerset: Wiley-Blackwell. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10683281>.

Wittekind, Christian (Hg.) (2017): TNM - Klassifikation maligner Tumoren. 8. Aufl. Leipzig, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Online verfügbar unter <http://lib.mylibrary.com/detail.asp?id=979300>.

Wittekind, Christian; Asamura, H.; Sobin, Leslie H. (2014): TNM Atlas. 6. Auflage. Hoboken: Wiley. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1641460>.

Wittekind, Christian; Tannapfel, Andrea (2006): Prinzipien der Pathologie in der Onkologie. In: *Kompodium internistische Onkologie*, S. 351–382.

Wittekind, Christian; Weber, A.; Weidenbach, H. (2001): Pathologie und Prognosefaktoren von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. In: *Der Onkologe* 7 (5), S. 498–504. DOI: 10.1007/s007610170102.

Wittekindt, Claus; Wagner, Steffen; Bushnak, Ayman; Prigge, Elena-Sophie; Knebel Doeberitz, Magnus von; Würdemann, Nora et al. (2019): Increasing Incidence rates of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Germany and Significance of Disease

Burden Attributed to Human Papillomavirus. In: *Cancer prevention research* 12 (6), S. 375–382. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0098.

Wittekindt, Claus; Wagner, Steffen; Mayer, Christina Sabine; Klussmann, Jens Peter (2012): Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. In: *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery* 11, 3-5. DOI: 10.3205/cto000091.

Wittekindt, Claus; Wagner, Steffen; Sharma, Shachi Jenny; Würdemann, Nora; Knuth, Jennifer; Reder, Henrike; Klußmann, Jens Peter (2018): HPV – Das andere Kopf-Hals-Karzinom. In: *Laryngorhinootologie* 97 (S 01), 48-113. DOI: 10.1055/s-0043-121596.

Wojzischke, Julia; Diekmann, Rebecca; Bauer, Jürgen M. (2016): Adipositas im Alter und ihre Bedeutung für Funktionalität und Frailty. In: *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 49 (7), S. 573–580. DOI: 10.1007/s00391-016-1133-y.

Wu, Yilun; Chen, Weiyu; Xu, Zhi Ping; Gu, Wenyi (2019): PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy-Blockade, Knockdown, or Inhibition. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02022.

Wuerdemann, Nora; Doescher, Johannes; Laban, Simon; Hoffmann, Thomas K.; Klussmann, Jens Peter (2019): Humane Papillomaviren und das Oropharynxkarzinom. In: *Der Onkologe* 25 (3), S. 224–231. DOI: 10.1007/s00761-018-0519-4.

Wuerdemann, Nora; Gültekin, Sibel E.; Pütz, Katharina; Wittekindt, Claus; Huebbers, Christian U.; Sharma, Shachi J. et al. (2020): PD-L1 Expression and a High Tumor Infiltrate of CD8+ Lymphocytes Predict Outcome in Patients with Oropharyngeal Squamous Cells Carcinoma. In: *IJMS* 21 (15), S. 5228. DOI: 10.3390/ijms21155228.

Yasui, Toshimichi; Morii, Eiichi; Yamamoto, Yoshifumi; Yoshii, Tadashi; Takenaka, Yukinori; Nakahara, Susumu et al. (2014): Human papillomavirus and cystic node metastasis in oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary origin. In: *PloS one* 9 (4), e95364. DOI: 10.1371/journal.pone.0095364.

Yoo, Shin Hye; Keam, Bhumsuk; Ock, Chan-Young; Kim, Sehui; Han, Buhm; Kim, Ji-Won et al. (2019): Prognostic value of the association between MHC class I downregulation and PD-L1 upregulation in head and neck squamous cell carcinoma patients. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 7680. DOI: 10.1038/s41598-019-44206-2.

Zaun, Gregor; Schuler, Martin; Herrmann, Ken; Tannapfel, Andrea (2018): CUP Syndrome-Metastatic Malignancy with Unknown Primary Tumor. In: *Deutsches Ärzteblatt international* 115 (10), S. 157–162. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0157.

Zech, Henrike Barbara; Betz, Christian Stephan; Bussmann, Lara; Böttcher, Arne; Stölzel, Katharina; Rieckmann, Thorsten (2022): Radiosensibilisierung durch duale Inhibition von Wee1 und PARP in ex vivo kultivierten HPV-negativen Kopf-Hals-Karzinomen (Primarius und Lymphknotenmetastase). In: *Laryngo- rhino- otologie* 101 (S02), S. 54–55. DOI: 10.1055/s-0042-1747316.

Zengel, Pamela; Assmann, Gerald; Mollenhauer, Martin; Jung, Andreas; Sotlar, Karl; Kirchner, Thomas; Ihrler, Stephan (2012): Cancer of unknown primary originating from oropharyngeal carcinomas are strongly correlated to HPV positivity. In: *Virchows Archiv* 461 (3), S. 283–290. DOI: 10.1007/s00428-012-1290-3.

ZfKD im Robert Koch-Institut (2016): Berichts zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Unter Mitarbeit von Benjamin Barnes, Klaus Kraywinkel, Enno Nowossadeck, Ina Schönfeld, Anne Starker, Antje Wienecke und Ute Wolf. Berlin: RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut).

ZfKD im Robert Koch-Institut (2020): Krebsregisterdaten - Datenbankabfrage, Zeitpunkt der Datenabfrage 25.06.2020. Hg. v. Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch Institut. Online verfügbar unter [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Datenbankabfrage/datenbankabfrage\\_stufe1\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe1_node.html).

Zhuang, Shi Min; Wu, Xi-Fu; Li, Jing-Jia; Zhang, Ge-Hua (2014): Management of lymph node metastases from an unknown primary site to the head and neck (Review). In: *Molecular and clinical oncology* 2 (6), S. 917–922. DOI: 10.3892/mco.2014.361.

Ziemann, Frank; Arenz, Andrea; Preising, Stefanie; Wittekindt, Claus; Klussmann, Jens P.; Engenhardt-Cabillic, Rita; Wittig, Andrea (2015): Increased sensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines to x-irradiation  $\pm$  Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis. In: *American Journal of Cancer Research* 5 (3), S. 1017–1031.

Zwiener, Isabella; Blettner, Maria; Hommel, Gerhard (2011): Survival Analysis. In: *Deutsches Ärzteblatt Online* 108 (10), S. 163–169. DOI: 10.3238/arztebl.2011.0163.

# 11 Anhang

## 11.1 SOP – Herstellung Gewebeschnitte

Auszug aus der SOP 13 aus dem Tumorforschungslabor HNO Gießen

### SOP – Herstellung Gewebeschnitte zur Immunhistochemie

#### Benötigte Materialien

- DNA lowbind Eppis
- Kanüle/ Pinsel
- Objektträger superfrost
- Klinge

#### Durchführung

- Einspannung der Probe
- Einstellen der Schnittdicke
- Zum Besseren Schneiden sollte die Probe gekühlt werden
- Schneiden der Proben
- Schnitt vorsichtig in ein „Streckbad“ überführt (= rundes Wasserbad (Leitungswasser), welches auf 37°C erwärmt wird und die Schnitte dadurch glättet)
- Schnitte so lange im Streckbad belassen, bis sich alle Falten geglättet haben
- Schnitte auf einen Objektträger ziehen
- die Objektträger werden auf eine Objektträger-Pappe platziert und im Trockenschrank bei 40°C 24h getrocknet.
- Die Schnitte können jetzt gefärbt werden



### SOP – Herstellung Gewebeschnitte „Röllchen“ für DNA-Untersuchungen

- Einspannung der Probe
- Die Schnittdicke auf 10µm einstellen (hier ist keine Kühlung notwendig!)
- Beim Schneiden der Probe entsteht an der Messerkante ein „Röllchen“
- Nun wird dieses entstandene Röllchen in ein DNA lowbind Eppi überführt

## **11.2 SOP –HE-Färbung**

Auszug aus der SOP 14 aus dem Tumorforschungslabor HNO Gießen

### **Benötigte Reagenzien/Materialien**

- Ethanol (verschiedene Konzentrationen)
- Xylol
- Eosin-Färbelösung
- Hämalaun-Färbelösung
- Roti Histokitt II
- Deckgläser

### **SOP – HE-Färbung**

- Die Schnitte werden zu Beginn deparaffiniert und rehydriert bevor die letztendliche Färbung erfolgt
  - 1x Xylol (alt) 10min
  - 1x Xylol (neu) 10min
  - 1x 100% Ethanol (alt) 5min
  - 1x 100% Ethanol (neu) 5min
  - 1x 96% Ethanol (alt) 5min
  - 1x 96% Ethanol (neu) 5min
  - 1x 70% Ethanol 5min
  - Kurz in VE-Wasser
- Im nächsten Schritt kommt die eigentliche Färbung
  - Hämalaun-Lösung 2min
  - Bläuen für 15min unter laufendem Leitungswasser
  - Inkubation in der Eosin-Lösung für 5min
  - Kurz in Wasser
- Nach erfolgreicher Färbung werden die Schnitte dann wieder dehydriert und mit einem Eindeckmedium und einem passend großem Deckglas eingedeckelt

## 12 Publikationsverzeichnis

Wagner, S.; Langer, C.; Wuerdemann, N.; Reiser, S.; Abing, H.; Pons-Kühnemann, J.; Prigge, E.-S.; von Knebel Doeberitz, M.; Gattenlöhner, S.; Waterboer, T.; et al. Predictors for Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of Unknown Primary in the Head and Neck Region. *Cancers* 2023, 15, 2167. <https://doi.org/10.3390/cancers15072167>

## 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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 mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Arbeit niemals zustande gekommen wären:

Zuerst möchte ich meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Claus Wittekindet, danken für die Betreuung dieser Arbeit sowie Ideen und Hilfen bei der konkreten Umsetzung.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. Steffen Wagner, für die Unterstützung während des experimentellen Teils im Labor sowie die Hilfestellung beim Verfassen und die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens. Sowohl die wissenschaftliche Betreuung als auch deine Hilfsbereitschaft waren mit stets eine große Unterstützung.

Meiner Schwester Christine Herter und meinem Ehemann Leo Reiser danke ich von ganzem Herzen für eifriges Korrekturlesen und viele motivierende Worte. Zudem möchte ich meinem Freund Harald Schmidt-Goerzt danken, der beim Korrekturlesen maßgeblich dazu beigetragen hat, dass diese Arbeit den Regeln der deutschen Kommasetzung genügt. Meinen Eltern möchte ich für die aufmerksame und liebevolle Unterstützung während dem Verfassen dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums danken.