

Expression des Programmed death-ligand 1 (PD-L1) auf
Tumorzellen HPV-assoziiierter Oropharynxkarzinome
und deren prognostische Bedeutung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von:
Schubotz, Anna Beatrice aus Mayen
Gießen (2021)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde,
Kopf-Hals-Tumorforschung

Gutachter: Prof. Dr. med. Claus Wittekindt

Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan Gattenlöhner

Tag der Disputation: 15.02.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Der Oropharynx.....	1
1.2. Das Oropharynxkarzinom.....	1
1.2.1. Epidemiologie und Ätiologie	1
1.2.2. Diagnostik und Staging	2
1.2.3. Klassifikation von OPSCC	3
1.2.4. Therapie und Prognose von OPSCC.....	5
1.3. Die humanen Papillomaviren (HPV)	5
1.3.1. Aufbau des Virus.....	6
1.3.2. Infektionswege	6
1.3.3. Pathogenese.....	6
1.3.4. Karzinogenese	7
1.3.5. Stoffwechsel bei HPV-getriebenen Karzinomen	8
1.3.6. Besondere Immunsituation bei HPV-getriebenen Karzinomen	8
1.4. Der <i>Programmed death-ligand 1</i> (PD-L1)	9
1.4.1. Lokalisation und molekulare Struktur von PD-L1	9
1.4.2. Funktion der PD-1/PD-L1-Achse	9
1.4.3. PD-L1 bedingter Immun-Escape von Tumorzellen	10
1.4.4. Inhibitoren der PD-1/PD-L1-Achse	12
1.5. HPV und PD-L1.....	12
1.6. Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Auswahl der Stichprobe und Patientendaten	14
2.2. Herstellung von Gewebepräparaten	14
2.3. Erhebung des HPV-Status	15
2.4. Immunhistochemie Vorversuch	16
2.5. Immunhistochemie im Färbeautomaten.....	20
2.6. Mikroskopische Auswertung	21
2.7. Statistische Auswertung	21
3. Ergebnisse	22
3.1. Tumorcharakteristiken und Risikofaktoren der untersuchten OPSCC in Hinblick auf den HPV-Status.....	22
3.2. PD-L1 Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen der untersuchten OPSCC	23
3.3. Univariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit OPSCC	26
3.4. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit OPSCC mittels Cox Regression	29
3.4.1. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit HPV-negativem OPSCC mittels Cox Regression.....	32
3.4.2. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC mittels Cox Regression	33
3.5. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit OPSCC mittels rekursiver Partitionierung	33

3.5.1. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit HPV-negativem OPSCC mittels rekursiver Partitionierung	36
3.5.2. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC mittels rekursiver Partitionierung	39
4. Diskussion.....	42
4.1. Die Stichprobe.....	43
4.2. Klinische Datenerhebung und experimentelle Vorgehensweise.....	45
4.3. PD-L1 Expression bei OPSCC	47
4.4. PD-L1 Expression bei HPV-negativen und HPV-getriebenen OPSCC.....	47
4.5. Univariate Analyse von Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben	50
4.6. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens mittels Cox Regression.....	52
4.6.1. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens mittels Cox Regression in Subkohorten stratifiziert nach dem HPV-Status.....	53
4.7. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens mittels rekursiver Partitionierung ...	54
5.1. Zusammenfassung und Ausblick.....	56
5.2. Summary and prospects.....	57
6. Abkürzungsverzeichnis	59
7. Abbildungsverzeichnis.....	62
8. Tabellenverzeichnis.....	63
9. Literaturverzeichnis	63
10. Anhang.....	72
11. Publikationsverzeichnis	73
12. Ehrenwörtliche Erklärung	74
13. Danksagung.....	75

1. Einleitung

1.1. Der Oropharynx

Der Oropharynx, auch Mesopharynx oder Mundrachen genannt, ist Teil des Pharynx, zu Deutsch Rachen. Er dient als gemeinsamer Weg für Atemluft und Nahrung. Der Oropharynx schließt sich an Nasopharynx und Mundhöhle an und führt in den Hypopharynx. Er wird durch folgende Strukturen begrenzt: kranial: Velum palatinum; kaudal: Oberrand der Epiglottis; ventral: Arcus palatoglossus und Arcus palatopharyngeus; dorsal: Fascia praevertebralis des zweiten und dritten Halswirbels. Anatomisch werden die Bereiche Zungengrund, Vallecula, Tonsillen, Fossa tonsillaris, Glosstonsillarfurche, Oropharynx-Hinterwand, orale Fläche des weichen Gaumens und Uvula zum Oropharynx zusammengefasst. Die Blutversorgung erfolgt über Äste der A. carotis externa und der Blutabfluss über die V. jugularis interna. Der Lymphabfluss findet über Lymphbahnen zu retropharyngealen, parapharyngealen oder tiefen Halslymphknoten statt. Der Oropharynx ist mit einer Schleimhaut aus mehrschichtigem, unverhornten Plattenepithel ausgekleidet. Unter dem Epithel befinden sich lymphatische Organe, die als Tonsillen bezeichnet werden. Sie dienen der Immunabwehr. Man kann die Tonsilla lingualis, Tonsilla palatina, Tonsilla pharyngealis, Tonsilla tubaria und die Seitenstränge unterscheiden. Das Epithel der Tonsillen hat eine durch Krypten vergrößerte Oberfläche, so dass ein besserer Antigenkontakt ermöglicht wird. Darunter liegen Lymphfollikel, in denen die Proliferation, antigenabhängige Differenzierung und Aktivierung von B- und T-Zellen stattfinden. Die Tonsillen werden zum sogenannten Waldeyer-Rachenring zusammengefasst und sind Teil des MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*).

1.2. Das Oropharynxkarzinom

1.2.1. Epidemiologie und Ätiologie

Oropharynxkarzinome (*oropharyngeal squamous cell carcinoma* = OPSCC) stellen weltweit 0,5% (2018: 92.887) aller Tumorneuerkrankungen dar (Bray et al. 2018). Sie werden zu den Kopf-Hals-Tumoren (*head and neck squamous cell carcinoma* = HNSCC) gezählt. Ätiologisch werden für die Entstehung von OPSCC verschiedene Faktoren verantwortlich gemacht. Zu den Hauptrisikofaktoren HPV-negativer OPSCC zählen Nikotin- und Alkoholabusus (Blot et al. 1988). Tabakrauch enthält viele verschiedene karzinogene Stoffe wie z.B. polyzyklische Aromaten oder tabakspezifische Nitrosamine (International Agency for Research on Cancer und IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans 1986). Ebenso gilt Alkohol

als karzinogen. Er wirkt durch eine verminderte Speichelproduktion direkt zellschädigend und erleichtert durch seine Eigenschaften als Lösungsmittel das Eindringen der Karzinogene des Tabakrauchs. Ein kombinierter Nikotin- und Alkoholabusus potenziert daher die karzinogene Wirkung beider Noxen (Blot et al. 1988). Bei HPV-negativen Tumoren geht man von einer mehrstufigen Entwicklung aus. Durch Noxen entstehen kumulativ immer mehr Mutationen, wobei hierbei die Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 eine entscheidende Rolle spielen. Aber auch genetische Prädispositionen und Umweltfaktoren sind von Bedeutung. Zum anderen kann eine Infektion mit *high-risk* HPV zur Bildung eines Malignoms beitragen (Smith et al. 1998). Bei HPV-getriebenen OPSCC ist die Karzinogenese vor allem durch die Aktivität viraler Onkoproteine (Abschnitt 1.3.4.) bedingt. Genetische Veränderungen spielen ebenfalls eine Rolle, scheinen jedoch weniger bedeutsam als bei HPV-negativen OPSCC zu sein. HPV-getriebene OPSCC zeigen in vielen Ländern weltweit eine ansteigende Prävalenz (Wittekindt et al. 2018), während Noxen-induzierte Tumoren rückläufig sind (Mifsud et al. 2017). Daher gewinnt die Betrachtung der HPV-getriebenen OPSCC zunehmend an Bedeutung.

1.2.2. Diagnostik und Staging

Symptome wie Halsschmerzen, Globusgefühl, Schwellung am Hals oder Odynophagie bis hin zur Dysphagie werden vom Patienten angegeben. Zur Abklärung der Beschwerden erfolgt zunächst eine komplette HNO-ärztliche Untersuchung. Dabei werden Mund und Rachen auf Veränderungen der Schleimhaut untersucht. Ebenso werden die Lymphknoten am Hals auf eventuell vorhandene Lymphknotenmetastasen abgetastet. Vor allem bei HPV-getriebenen Tumoren kann es auch bei einem kleinen Primarius zu großen Lymphknotenmetastasen kommen, die dem Betroffenen als erstes Symptom auffallen. Um die Ausbreitung des Tumors darzustellen, erfolgt in der Regel eine Bildgebung. Dabei kommen Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und Sonographie zum Einsatz. Mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) in Kombination mit der CT kann die Stoffwechsellage des Tumors abgeschätzt werden. Hierfür wird dem Patienten meist ein radioaktiv markiertes Glukoseanalogon (2-Fluor-2-desoxy-D-glukose = FDG) appliziert, welches sich in besonders stoffwechselaktivem Gewebe (z.B. Tumorgewebe) anreichert. Auf Grund des veränderten Metabolismus durch die Infektion mit HPV (Abschnitt 1.3.5.) stellen sich HPV-getriebene im Gegensatz zu HPV-negativen OPSCC in der PET homogen dar (Sharma et al. 2017). Zur histologischen Sicherung müssen Proben des Tumors entnommen werden. Dies kann in lokaler Betäubung oder in Narkose erfolgen. Im

Rahmen einer Panendoskopie können zudem die Tumorausdehnung und mögliche Rekonstruktionsverfahren abgeschätzt werden. Hierbei können ebenfalls Zweitkarzinome ausgeschlossen werden (Wittekindt et al. 2018). Zum Nachweis des HPV-Status wird eine Kombination von p16^{INK4a} Testung und HPV-DNA Test empfohlen (Prigge et al. 2017).

1.2.3. Klassifikation von OPSCC

Mit Hilfe der TNM-Klassifikation können die Tumoren in verschiedene Stadien eingeteilt werden. Dabei werden die Ausdehnung des Primärtumors (T = Tumor), das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen (N = *Node*) und die hämatogene Fernmetastasierung (M = Metastase) betrachtet (Tabelle 1). Daraus ergibt sich eine international verwendete Tumorformel. Da es viele verschiedene Kombinationen aus T-, N- und M-Kategorie gibt, werden diese zur Prognoseabschätzung und Therapieentscheidung in vier UICC-Stadien („*Union internationale contre le cancer*“) zusammengefasst (Tabelle 2).

In dieser Arbeit wurde die bis 2017 verwendete 7. Auflage der „TNM-Klassifikation maligner Tumoren“ verwendet (Sobin et al. 2011). Seit der 8. Auflage der „TNM-Klassifikation maligner Tumoren“ werden zwei verschiedene Entitäten der OPSCC anhand der Expression von p16^{INK4a} unterschieden (Brierley et al. 2017).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation nach UICC 7

T-/N-/M-Kategorie	Definition
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Hinweis auf Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2cm, aber nicht mehr als 4cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4cm, oder Ausdehnung zur linguale Oberfläche der Epiglottis
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hypoglossus, M. palatoglossus, M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, harter Gaumen oder Unterkiefer
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt A. carotis interna
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, 3cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2a	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, mindestens 3cm, aber nicht mehr als 6cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten mit mehr als 6cm in größter Ausdehnung
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastase(n) vorhanden

Tabelle 2: UICC 7 Stadieneinteilung

UICC 7-Stadium	Tumorausbreitung T	Lymphknotenmetastasen N	Fernmetastasen M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IVa	T4	N0, N1	M0
	Jedes T	N2	M0
IVb	Jedes T	N3	M0
IVc	Jedes T	Jedes N	M1

Tumorausbreitung, Lymphknoten- und Fernmetastasen nach TNM-Klassifikation

1.2.4. Therapie und Prognose von OPSCC

Die Therapie von OPSCC setzt sich häufig aus mehreren Komponenten zusammen und wird dann als multimodal bezeichnet. Aktuell werden in Deutschland eine Operation, gegebenenfalls in Kombination mit einer Radio- und Chemotherapie, oder in fortgeschrittenen Stadien eine primäre Radiochemotherapie empfohlen. Je nach Lokalisation und Tumor-ausdehnung erfolgt nach der chirurgischen Tumorentfernung der Wundschluss primär oder mit Hilfe eines gestielten oder freien Lappens (z.B. Radialislappen). Abhängig vom Stadium wird ebenfalls eine so genannte „*Neck dissection*“ ein- oder beidseitig durchgeführt. Dabei können die selektive (nur bestimmte Regionen), die modifiziert-radikale (Ausräumung aller Halslymphknoten) und die radikale (Lymphknoten, M. sternocleidomastoideus, V. jugularis interna und N. accessorius) *Neck dissection* unterschieden werden. Im Gegensatz zu diesem primär chirurgischen Vorgehen wird in einigen Ländern eine primäre Radiochemotherapie bevorzugt (O'Sullivan et al. 2016). In den USA wird neuerdings auch ein primär chirurgisches Vorgehen mit Hilfe von transoraler Roboterchirurgie der primären Radiochemotherapie vorgezogen (Nichols et al. 2019).

Patienten mit HPV-getriebenem Tumor haben ein deutlich besseres Überleben als solche mit HPV-negativem Tumor (3-Jahres-Überleben: 82,4% vs. 57,1%; Ang et al. 2010). Auf Grund dieser erheblich besseren Prognose wird die Möglichkeit einer Therapiedeeskulation bei HPV-getriebenen OPSCC erforscht.

1.3. Die humanen Papillomaviren (HPV)

Humane Papillomaviren (HPV) gehören zur Familie der Papillomaviridae und sind unbehüllte, epitheliotrope doppelsträngige DNA-Viren. Sie infizieren Epithelzellen der äußeren Haut (kutanotrop) oder von Schleimhäuten (mukosotrop). Dabei kann diese große Virengruppe anhand der Tendenz der infizierten Zellen maligne zu entarten, in Niedrigrisiko (>150, „*low-risk*“) und Hochrisiko (ca. 15, „*high-risk*“) Typen unterschieden werden (Wagner et al. 2017). Während die *low-risk* Typen vor allem Warzen und Papillome verursachen, kann es bei Infektion mit den *high-risk* Typen zu präkanzerösen Läsionen und schlussendlich zur Entstehung von Krebs kommen. Dieser Zusammenhang von HPV und Krebs wurde erstmals von Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Harald zur Hausen bei Cervixkarzinomen beschrieben. 1985 wurde die DNA eines *high-risk* Typs (HPV16) in Mundhöhlen-karzinomen gefunden (Löning et al. 1985).

1.3.1. Aufbau des Virus

Ein ikosaedrisches Kapsid (ca. 55nm Durchmesser) umhüllt das Virusgenom. Dieses doppelsträngige DNA-Molekül ist ca. 8 Kilobasenpaare groß und ringförmig geschlossen. Das Genom wird in eine E-Region (*early region*), eine L-Region (*late region*) und eine nicht kodierende Region (*noncoding region* = NCR) eingeteilt (Danos et al. 1982). Regulatorische Gene liegen in der E-Region. Sie kodiert die Proteine E1-E8 (Abschnitt 1.3.3.), wobei E6 und E7 eine onkogene Aktivität besitzen (Abschnitt 1.3.4.) Die L-Region beinhaltet die Struktur-Gene, die die Proteine L1 und L2 kodieren (Abschnitt 1.3.3.). Die Viruspartikel sind unbehüllt (fehlende Lipidhülle) und weisen dadurch eine hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen auf (Ding et al. 2011).

1.3.2. Infektionswege

HPV wird direkt durch Haut-/Schleimhautkontakt oder indirekt durch Kontakt mit kontaminierten Gegenständen (z.B. über den Boden im Schwimmbad) übertragen (Wittekindt et al. 2018). Eine vertikale Übertragung von der Mutter auf das Kind während des Geburtsvorgangs ist ebenfalls möglich (Alberico et al. 1996). Bei den *high-risk* Typen vermutet man vor allem einen sexuellen Übertragungsweg (Gillison et al. 2008). Das Virus dringt beispielsweise durch Mikrowunden in der Haut/Schleimhaut ein und infiziert undifferenzierte Epithelzellen der Basalschicht.

1.3.3. Pathogenese

Die Replikation des Virus findet in der Epidermis statt. Nach Aufnahme des Kapsids in die Basalzelle und Entmantelung („*uncoating*“) werden zu Beginn des HPV Reproduktionszyklus die sogenannten „E“-Proteine (E1-E8) exprimiert, wobei „E“ für „*early*“ steht. Diese Proteine dienen der Virusvermehrung in der Zelle. E1 ist eine Adenosintriphosphat (ATP) abhängige DNA Helikase und für die Genomreplikation von HPV notwendig (Hughes und Romanos 1993). Das E2-Gen kodiert drei für die Replikation erforderliche regulatorische Proteine, ein Aktivator- und zwei Repressor-Proteine (McBride et al. 1991). Durch Teilung der infizierten Basalzelle werden die Tochterzellen mit dem Virus in höhere Zellschichten geschoben. Nichtinfizierte suprabasale Epithelzellen treten an diesem Punkt in die G₀-Phase des Zellzyklus ein, sie differenzieren sich und sind nicht mehr teilungsfähig. Im Gegensatz dazu verhindern E6 und E7 den Eintritt in die G₀-Phase und fördern die Proliferation der infizierten epidermalen Zelle, da es so zur Virusreplikation kommt (Banerjee et al. 2006). In höhere

Hautschichten werden die „L“-Proteine (L1 und L2; „late“) exprimiert. Diese bilden die Kapsidstruktur (Florin et al. 2002). Kommt es zur physiologischen Abschilferung der obersten Epithelzellen, werden die Viren mit den Hautpartikeln an die Umwelt abgegeben. Im Gegensatz zu anderen Viren ist die Infektion mit HPV auf die Epidermis begrenzt. Viele Infektionen sind selbstlimitierend und verschwinden innerhalb eines Jahres wieder (Kreimer et al. 2013). Seltener kommt es zu länger persistierenden Infektionen. Dann kann es wie in Abschnitt 1.3.4. beschrieben zur Karzinogenese kommen. Die Latenzzeit von der Infektion bis zum Auftreten eines Tumors kann viele Jahre bis Jahrzehnte betragen. So zeigten z.B. Mork et al. eine Latenzzeit von bis zu 20 Jahren (Mork et al. 2001).

1.3.4. Karzinogenese

Bei der HPV-getriebenen Karzinogenese kann die Virus-DNA episomal in der Zelle vorliegen (Olthof et al. 2014) oder wird in die DNA der Wirtszelle integriert (Kim et al. 2007). Für die Integration wird die ringförmige DNA gespalten, wodurch Teile oder auch das gesamte E1 und E2 Gen verloren gehen können (Matsukura et al. 1986). Dadurch können die Repressor-Proteine E2 nicht mehr synthetisiert werden und die drosselnde Wirkung auf die Genexpression von E6 und E7 entfällt (Cripe et al. 1987). Durch die verstärkte Expression von E6 und E7 wird eine Dysregulation der Tumorsuppressoren p53 und des Retinoblastom (Rb)-Proteins ausgelöst und es kommt zur Karzinogenese. Physiologisch verhindert das Protein p53 bei vorliegenden DNA Schäden den Eintritt der Zelle in die S-Phase. Dazu wird es phosphoryliert und deshalb nicht ubiquitiniert und abgebaut. E6 verursacht durch Aktivierung der Ubiquitinligase E6AP die Ubiquitinierung von p53, wodurch dieses im Proteasom abgebaut wird (Huibregtse et al. 1993). Die Wirkung von p53 entfällt somit völlig. Der Eintritt in die S-Phase wird zudem durch das Rb-Protein gehemmt, wenn dieses an E2F-Transkriptionsfaktoren bindet. E7 heftet sich an das Rb-Protein und inaktiviert es (Dyson et al. 1989). Dadurch werden die E2F-Transkriptionsfaktoren freigesetzt und die S-Phase induziert.

Bei HPV-getriebenen OPSCC findet man eine Überexpression von p16^{INK4a}. p16^{INK4a} ist ein Tumorsuppressor, der bei okogenem Stress vermehrt gebildet wird. Normalerweise hemmt er die Bindung von *Cyclin-dependant kinase 4 und 6* (CDK4/6) an Cyclin D. Auf diese Weise wird das Rb-Protein nicht phosphoryliert, E2F-Transkriptionsfaktoren binden daran und die Zelle bleibt im Zellzyklusarrest. Bei der HPV-getriebenen Karzinogenese führt E7 zur Aktivierung der Histon-Lysin-Demethylase KDM6B und dadurch zur Akkumulation des Proteins p16^{INK4a} in den Zellen (McLaughlin-Drubin et al.

2013). Da gleichzeitig das Rb-Protein durch E7 im Proteasom abgebaut wird, kommt es trotz p16^{INK4a} Überexpression nicht zum Zellzyklusarrest. KDM6B und p16^{INK4a} sind für das Überleben der Tumorzelle nötig, da die Aktivität von CDK4/6 bei fehlendem Rb-Protein zum Zelltod zu führen scheint (Munger et al. 2013).

Für das Virus ist die Entstehung eines Tumors jedoch eine „Endstation“, da durch die ausbleibende Differenzierung der Epithelzellen keine Viruspartikel gebildet und freigesetzt werden können (Middleton et al. 2003).

1.3.5. Stoffwechsel bei HPV-getriebenen Karzinomen

Viele Tumoren nutzen den „Warburg-Effekt“ zur Energiegewinnung. Hierbei wird Glucose durch die Glykolyse über Pyruvat zu Laktat abgebaut, wodurch Energie freigesetzt wird. Zudem nutzen Tumorzellen die Intermediate wie z.B. Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) zur Baustoffsynthese für die Proliferation (Denko 2008). HPV nutzt vermutlich den Warburg-Effekt ebenfalls zur Baustoffsynthese, denn Acetyl-CoA kann in anabolen Prozessen zur Virusreplikation verwendet werden (Martínez-Ramírez et al. 2018). Experimentelle Arbeiten zeigen, dass der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 α (HIF-1 α), der normalerweise nur unter Hypoxie stabil ist, in HPV infizierten Zellen auch unter Normoxie nicht abgebaut wird (Knuth et al. 2017). E6 und E7 stabilisieren HIF-1 α (Nakamura et al. 2009), wodurch der Warburg-Effekt unterstützt wird. Kommt es getrieben durch HPV zur Zellentartung, kann dieser Effekt das Tumorwachstum fördern. Dieser veränderte Metabolismus lässt sich in der PET erkennen. Hier zeigen HPV-getriebene im Gegensatz zu HPV-negativen OPSCC eine homogenere Glucoseanreicherung (Sharma et al. 2017).

1.3.6. Besondere Immunsituation bei HPV-getriebenen Karzinomen

Bereits in frühen Stadien der Infektion findet man in der Umgebung der Epithelzellen vermehrt Zellen des angeborenen Immunsystems, z.B. dendritische Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder Langerhans-Zellen (Amador-Molina et al. 2013). HPV findet jedoch Wege dem Immunsystem zu entkommen. Da Immunzellen vor allem in den tieferen Schichten der Haut vorkommen und die Virusfreisetzung an der Oberfläche stattfindet, kommen sie nicht mit Viruspartikeln in Kontakt. Daher werden auch kaum Antikörper gegen HPV gebildet. Bei HPV-infizierten Zellen verhindert das virale Onkoprotein E5 die Expression von Humanem Leukozytenantigen-Klasse-I Molekülen (HLA-I) auf der Oberfläche (Ashrafi et al. 2006). Infolgedessen werden keine

Virusantigene auf der Zelloberfläche über HLA-I präsentiert, wodurch die infizierten Wirtszellen vom Immunsystem nicht erkannt werden. Normalerweise exprimieren Zellen HLA-I auf ihrer Oberfläche, um einer durch NK-Zellen hervorgerufenen Autoimmunreaktion („*missing-self*“) vorzubeugen. Durch den Verlust von HLA-I auf der Zelloberfläche werden jedoch NK-Zellen angezogen. So konnte gezeigt werden, dass in HPV-getriebenen im Gegensatz zu HPV-negativen OPSCC mehr NK-Zellen zu finden sind (Wagner et al. 2016).

1.4. Der *Programmed death-ligand 1* (PD-L1)

1.4.1. Lokalisation und molekulare Struktur von PD-L1

Der *Programmed death-ligand 1* (PD-L1) ist ein Typ-1-Transmembranprotein, was bedeutet, dass sich der N-terminus des Proteins extrazellulär befindet. Es besteht insgesamt aus 290 Aminosäuren. Die extrazelluläre Domäne ähnelt der von Immunglobulinen und besteht aus einem variablen und einem konstanten Anteil. Daran schließt sich eine hydrophobe transmembrane Domäne und ein 30 Aminosäuren langer zytoplasmatischer Teil an (Dong et al. 1999). Die variable Domäne wird genutzt um einen 1:1 Komplex mit dem Rezeptor *Programmed cell death protein 1* (PD-1) auf T-Zellen einzugehen (Lin et al. 2008). PD-L1 wird auf verschiedenen Zellen wie z.B. Skelettmuskelzellen, im Herz, in der Lunge und in der Plazenta verhältnismäßig stark, in Milz-, Leber-, Thymus- und Nierengewebe hingegen nur wenig exprimiert (Dong et al. 1999). Zudem wird PD-L1 auf dendritischen Zellen, Monozyten und Keratinozyten exprimiert (Freeman et al. 2000). PD-L1 gehört zur B7 Familie und wird daher auch als *B7 homolog 1* (B7-H1) bezeichnet.

1.4.2. Funktion der PD-1/PD-L1-Achse

Proteine der B7 Familie modulieren die T-Zell Antwort. PD-L1 führt durch Bindung an PD-1 zu einer Inhibition der Lymphozyten-Proliferation und Zytokinsekretion (Freeman et al. 2000). Dies bewirkt eine periphere T-Zell-Toleranz und verhindert so Autoimmunreaktionen (Keir et al. 2006). Die immunregulatorische Rolle der PD-1/PD-L1-Achse wird deutlich, wenn man die Auswirkungen einer fehlenden Expression betrachtet. So entwickelt sich bei Mäusen ohne PD-L1 Expression ein autoimmunbedingter Diabetes (Keir et al. 2006). Mäuse, die kein PD-1 exprimieren, erkranken an Lupus ähnelnder proliferativer Arthritis und Glomerulonephritis, ebenso wie

an autoimmunbedingter dilatativer Kardiomyopathie (Nishimura et al. 1999; Nishimura et al. 2001).

Durch Bindung von PD-L1 an PD-1 wird das Immunrezeptor Tyrosin-basierte hemmende Motiv (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif* = ITSM) phosphoryliert. Dadurch binden *Src homology region 2 domain-containing phosphatase* (SHP)-1 und SHP-2 an PD-1, wodurch die Aktivität der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und somit auch die der Proteinkinase B (PKB) gehemmt wird (Parry et al. 2005; Chemnitz et al. 2004). Dies hat zur Folge, dass die Zytokinproduktion (Interferon- γ = IFN γ ; Tumornekrosefaktor- α = TNF- α ; Interleukin-2 = IL-2), Zellproliferation, -differenzierung und -überleben vermindert sind (Keir et al. 2006; Jones et al. 2000; Riella et al. 2012). Zudem wird der T-Zell-Rezeptor (TCR) Signalweg durch die Bindung von PD-L1 an PD-1 herunterreguliert. Dabei wird die Phosphorylierung von *Zeta-chain-associated protein kinase 70* (ZAP70) und CD3 ζ inhibiert. Hierdurch können sie keine Verbindung eingehen und es kommt nicht zur Signaltransduktion (Sheppard et al. 2004). Des Weiteren wird die Phosphorylierung von *Protein kinase C theta* (PKC θ) inhibiert, die für die IL-2 Produktion der T-Zellen benötigt wird (Sheppard et al. 2004; Pfeifhofer et al. 2003). So wird unter physiologischen Bedingungen eine überschießende, durch T-Zellen vermittelte Immunreaktion verhindert (Abbildung 1).

1.4.3. PD-L1 bedingter Immun-Escape von Tumorzellen

Tumorzellen, die PD-L1 auf ihrer Oberfläche exprimieren, können an PD-1 auf T-Zellen binden und so die TCR vermittelte zytotoxische Reaktion inhibieren (Abbildung 1). Dies wird als „Immun-Escape“ bezeichnet. Solche Tumorzellen zeigen ein verbessertes Wachstum und eine stärkere Ausbreitung im Vergleich zu entsprechenden Tumorzellen ohne PD-L1 Expression (Iwai et al. 2002). Die Expression von PD-L1 konnte bei diversen Tumoren nachgewiesen werden. So exprimieren z.B. einige Lungenkarzinome (*Non-small cell lung cancer* = NSCLC), Melanome, Kolonkarzinome, Nierenzellkarzinome oder auch Cervixkarzinome PD-L1 (Konishi et al. 2004; Yang et al. 2008; Shi et al. 2013; Thompson und Kwon 2006; Reddy et al. 2017). Dabei zeigt die Expression unterschiedliche Auswirkungen auf das Überleben der Patienten. Für z.B. Nierenzellkarzinome und einige NSCLC konnte PD-L1 als negativer prognostischer Faktor herausgestellt werden (Thompson und Kwon 2006; Chen et al. 2012). Im Gegensatz dazu konnte PD-L1 als positiver Faktor für das Überleben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, Kolonkarzinomen, frühen Plattenepithelkarzinomen und EBV-assoziierten lymphoepithelioma-ähnlichen Karzinomen der Lunge

bestätigt werden (Jiang et al. 2017; Droesser et al. 2013; Schmidt et al. 2015; Jiang et al. 2015). Auch HNSCC allgemein und Tonsillenkzinome im speziellen exprimieren zum Teil PD-L1 (Feldman et al. 2016; Hong et al. 2016). Die PD-L1 Expression wies bei HNSCC in verschiedenen Studien ebenfalls unterschiedliche Einflüsse auf das Überleben auf [positive (Jia et al. 2019; Hong et al. 2016); keine (Kim et al. 2016; Li et al. 2017); negative (Müller et al. 2017)].

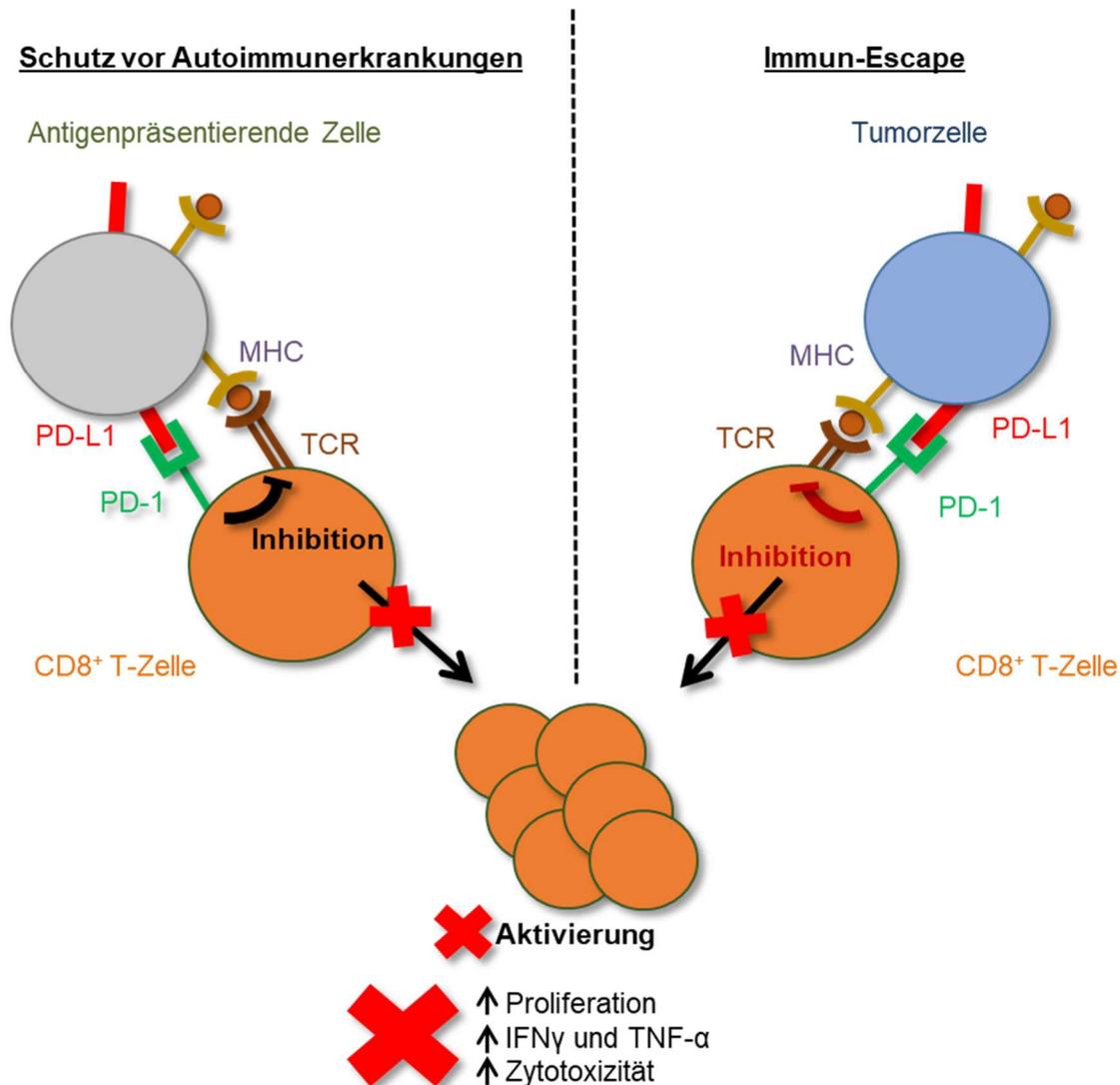


Abbildung 1: PD-L1 Expression auf antigenpräsentierenden Zellen inhibiert die TCR vermittelte Aktivierung der CD8⁺ T-Zelle, sodass es nicht zu Proliferation, Zytotoxizität und Sekretion von IFN γ , IL-2 und TNF- α kommt, zum Schutz vor Autoimmunerkrankungen. Den gleichen Mechanismus nutzen Tumorzellen, was als Immun-Escape bezeichnet wird. (MHC = *major histocompatibility complex*)

1.4.4. Inhibitoren der PD-1/PD-L1-Achse

Seit einiger Zeit werden Inhibitoren der PD-1/PD-L1-Achse in der Therapie verschiedener Tumorentitäten eingesetzt. Bei HNSCC werden PD-1-Inhibitoren im rezidierten oder metastasierten Stadium angewandt. Sie blockieren die Bindungsstelle von PD-1 für PD-L1 (Lee et al. 2016), wodurch die T-Zellen mit ihrem PD-1 Rezeptor nicht mehr an PD-L1 auf Tumorzellen binden können und diese „immun-resistenten“ Tumorzellen angreifbar werden. Durch Einsatz von PD-1 Inhibitoren konnte bei einigen Tumoren, z.B. beim fortgeschrittene Melanom oder NSCLC, das Überleben der Patienten verlängert werden (Robert et al. 2015; Herbst et al. 2016). Die „KEYNOTE-048 Studie“ (Burtneß et al. 2019) konnte für HNSCC zeigen, dass eine Kombination aus Chemotherapie und PD-1 Inhibitor einer Chemotherapie in Kombination mit Cetuximab in Bezug auf das Gesamtüberleben überlegen ist. Jedoch treten unter diesen Therapien mit PD-1 Inhibitoren auch autoimmunbedingte Nebenwirkungen wie z.B. Autoimmun-kolitis, -hepatitis, Endokrinopathien, Pneumonitis oder Kardiomyopathien auf.

1.5. HPV und PD-L1

Ein Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und der PD-L1 Expression wird vermutet. Studien zur PD-L1 Expression bei HNSCC und bei Cervixkarzinomen zeigen eine Korrelation (Hong et al. 2016; Meng et al. 2018). Auch HPV-getriebene Läsionen der Cervix (Vorläufer für Cervixkarzinome) zeigen eine erhöhte PD-L1 Expression (Yang-Chun et al. 2017). Die durch HPV vorliegende besondere Immunsituation in OPSCC (Abschnitt 1.3.6.) ist ein Argument für das Zusammenspiel von HPV und PD-L1. Eine HLA-I Herabregulation, wie sie z.B. durch HPV angetrieben vorkommt, führt zu einer PD-L1 Heraufregulation (Sottile et al. 2016). Ebenso spricht der veränderte Stoffwechsel (Abschnitt 1.3.5.) bei HPV-getriebenen OPSCC dafür. HIF-1 α , welches eine zentrale Rolle in diesem Stoffwechsel spielt, bindet an den Enhancer des PD-L1 Gens. Dadurch wird die Expression von PD-L1 ebenfalls heraufreguliert (Noman et al. 2014; Zhao et al. 2019). All dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen HPV-getriebener Karzinogenese und PD-L1 Expression hin. Jedoch wurde die PD-L1 Expression von OPSCC in Hinblick auf den HPV-Status nur in wenigen Studien untersucht (Kim et al. 2016; Lyford-Pike et al. 2013). Auch stellt sich die Frage, inwieweit sich die PD-L1 Expression als potenzieller Immun-Escape-Mechanismus auf das Überleben der Patienten auswirkt.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

PD-L1 wurde auf der Oberfläche von Tumorzellen verschiedenster Entitäten wie z.B. dem Lungenkarzinom oder dem malignen Melanom gefunden. Durch die Bindung von PD-L1 an den PD-1-Rezeptor auf Immunzellen kommt es zum so genannten „Immun-Escape“, das heißt die Tumorzellen werden von den Immunzellen nicht zerstört, da diese inaktiviert werden. Mit dem Ziel, diesen Immun-Escape zu umgehen, werden in der Therapie von einigen Karzinomen Immuncheckpoint-Inhibitoren eingesetzt. Dazu zählen auch Inhibitoren der PD-1/PD-L1-Achse, die zur Aktivierung der körpereigenen Tumorabwehr führen (Ribas et al. 2016; Iwai et al. 2002).

HPV-getriebene OPSCC tragen häufig Mutationen, wie z.B. in HLA- und β 2-Mikroglobulin-Genen, die zu einem Immun-Escape führen können. Des Weiteren wurde in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass in HPV-getriebenen OPSCC mehr NK-Zellen vorhanden sind. Dies lässt auf eine besondere Immun-Situation und bestehende immunmodulatorische Einflüsse durch die HPV-bedingte Karzinogenese schließen. Daher erwarten wir, dass sich auch die Expression von PD-L1 in der Gruppe der HPV-getriebenen OPSCC von der in der Gruppe der HPV-negativen OPSCC unterscheidet.

Um zu klären, ob PD-L1-Inhibitoren auch für die kurative Therapie von Oropharynxkarzinomen sinnvoll eingesetzt werden könnten, soll in dieser Arbeit zunächst untersucht werden, inwieweit PD-L1 auf den Tumorzellen von OPSCC exprimiert wird. Es soll weiterhin herausgefunden werden, mit welchen Faktoren die Expression von PD-L1 zusammenhängen könnte. Dabei soll im Speziellen auf die Unterschiede zwischen HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC geachtet werden. Um diese Fragestellungen zu beleuchten sollen Tumorproben von OPSCC, die zwischen 2000 und 2017 in Gießen diagnostiziert und behandelt wurden, mittels Immunhistochemie auf die Expression von PD-L1 untersucht werden. Des Weiteren sollen die Daten dieser Patienten retrospektiv ausgewertet werden und die Variablen: HPV-Status, UICC-Stadium, TNM-Stadium, Nikotin- und Alkoholkonsum, Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand (ECOG-Stadium) auf einen Zusammenhang mit der PD-L1 Expression untersucht werden. Konkret sollten die folgenden Hauptfragen nach Durchführung der Experimente und Auswertung der Daten beantwortbar sein:

1. Wird PD-L1 häufiger in HPV-getriebenen Oropharynxkarzinomen exprimiert als in HPV-negativen Tumoren?
2. Hat die PD-L1 Expression durch den Immun-Escape einen Einfluss auf das Überleben der Patienten?

2. Material und Methoden

2.1. Auswahl der Stichprobe und Patientendaten

Um die PD-L1 Expression bei OPSCC in Hinblick auf den HPV-Status zu untersuchen, wurde durch Mitarbeitende des Instituts für Pathologie der Uniklinik Köln ein *Tissue microarray* (TMA) angefertigt (Wuerdemann et al. 2020). Für die Herstellung des TMA wurden alle für dieses Verfahren geeigneten Archivproben von OPSCC verwendet, die zwischen 2000 und 2009 in Gießen diagnostiziert und behandelt wurden (n=157). Sie sind Teil einer Publikation unserer Arbeitsgruppe (Wuerdemann et al. 2020). Damit möglichst viele HPV-getriebene OPSCC in die Stichprobe dieser Arbeit eingeschlossen werden konnten, wurden von allen HPV-getriebenen OPSCC, die aus technischen Gründen (zu dünner Gewebekblock, nur Biopsie vorhanden/ zu wenig Tumorgewebe) nicht in das TMA einbezogen werden konnten, Flächenschnitte angefertigt. Zudem wurden von allen HPV-getriebenen OPSCC, die zwischen 2010 und 2017 diagnostiziert und behandelt wurden, ebenfalls Flächenschnitte angefertigt. Außerdem wurden Flächenschnitte von HPV-negativen OPSCC, die bezüglich TNM-Stadium, Alter und Geschlecht zu Proben der HPV-getriebenen Flächenschnitte passten (*gematcht*), hergestellt. Es wurden insgesamt von 122 OPSCC Proben Flächenschnitte angefertigt, wovon einer nach der immun-histochemischen Färbung nicht auswertbar war und ausgeschlossen werden musste. Somit umfasst die gesamte untersuchte Stichprobe 278 OPSCC, die zwischen 2000 und 2017 am Uniklinikum Gießen in der Abteilung für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde diagnostiziert und behandelt wurden.

Die Erhebung der klinischen Daten und Risikofaktoren der Patienten erfolgte retrospektiv anhand von dokumentierten Befunden und Anamnesegesprächen. Falls möglich wurde das pathologische TNM-Stadium verwendet. Das klinische TNM-Stadium wurde bei Patienten verwendet, die ohne Operation behandelt wurden. Für die Betrachtung des Gesamtüberlebens wurden die aktuellsten Daten aus der regelmäßigen Tumornachsorge oder Daten des GTDS (Gießener Tumordokumentationssystem) benutzt.

2.2. Herstellung von Gewebepreparaten

Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) OPSCC Gewebeproben wurden aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen herausgesucht.

Für die Flächenschnitte wurden von den Gewebekblockchen mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms der Firma Leica (Modell SM2010R) 2,5 µm dicke Gewebeschnitte

angefertigt. Diese wurden auf ein Paraffin-Streckbad (GFL, Modell 1052) bei 40°C gegeben, um die Proben glatt auf Superfrost-Plus Objektträger aufziehen zu können. Danach wurden die Schnitte für 24 Stunden bei 37°C in einem Trockenschrank (Binder, Modell ED53) getrocknet.

Die Herstellung des TMA erfolgte durch Mitarbeitende des Instituts für Pathologie der Uniklinik Köln. Dort wurden aus den Paraffin-Gewebeblöckchen Zylinder mit einem Durchmesser von 1,2 mm mit Hilfe einer selbstkonstruierten halbautomatischen Maschine gestanzt. Diese Zylinder wurden in leere, sogenannte „Empfänger“ Paraffinblöckchen eingesetzt. Von diesen neu entstandenen TMA-Gewebeblöckchen wurden mit einem Mikrotom 4 µm dicke Schnitte hergestellt und diese analog zu oben auf Objektträger (Instrumedics Inc., Hackensack, NJ) aufgezogen und getrocknet (Wuerdemann et al. 2020).

2.3. Erhebung des HPV-Status

Die Erhebung des HPV-Status wurde von Mitarbeitenden der Abteilung für angewandte Tumorbologie des pathologischen Instituts der Universität Heidelberg durchgeführt.

Zum Nachweis der HPV-DNA wurden ca. 10x10mm und 10 µm dicke Schnitte von FFPE Tumorgewebebeurproben angefertigt, in *DNA-LoBind-Tubes* der Firma Eppendorf gegeben und zur weiteren Bearbeitung nach Heidelberg verschickt. Mit Hilfe des *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde dort die DNA extrahiert. Zur Detektion und Genotypisierung wurde das *Multiplex HPV Genotyping Kit for Research in Epidemiology* (Multimetrix, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Die p16^{INK4A} Expression wurde durch immunhistochemische (IHC) Färbung von FFPE Schnitten nachgewiesen. Für die Färbung wurde das *CINtec Histology Kit* (Roche mtm Laboratories) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch durch zwei unabhängige, verblindete Untersucher (Mitarbeitende der Abteilung für angewandten Tumorbologie des pathologischen Instituts der Universität Heidelberg).

Als HPV-getriebene OPSCC wurden diejenigen Proben klassifiziert, bei denen sowohl high-risk HPV-DNA als auch eine diffuse p16^{INK4A} Expression in >70% der Tumorzellen nachweisbar waren.

2.4. Immunhistochemie Vorversuch

Mit den Flächenschnitten wurde eine IHC Färbung als Vorversuch durchgeführt. Die FFPE Gewebeschnitte wurden zuerst entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe wie nachfolgend rehydriert:

- 1x Xylol (älteres) 10 min
- 1x Xylol (frischeres) 10 min
- 2x Ethanol 100% 5 min
- 2x Ethanol 96% 5 min
- 1x Ethanol 70% 5 min
- Spülen in voll entsalztem Wasser (VE)

Anschließend erfolgte die Renaturierung der Antigene mittels *Target Retrieval Solution* (pH 6) und feuchter Hitze in einer Mikrowelle (Tabelle 5) zuerst 2 Minuten bei 60% Leistung und dann weitere 15 Minuten bei 10% Leistung. Danach wurden die Schnitte für 30 Minuten zum Abkühlen und Renaturierung der Antigene stehen gelassen.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidasen erfolgte eine Inkubation (20min) in einer H₂O₂-Methanol-Lösung (2ml 30% H₂O₂ und 98ml Methanol). Danach wurde eine hydrophobe Barriere mit einem Fettstift (*PAP pen immunostaining*, Tabelle 5) aufgetragen. So konnten bei den nachfolgenden Schritten die Lösungen direkt auf das Gewebe auf dem Objektträger (OT) gegeben werden, wodurch Material und Antikörper eingespart werden konnten. Um unspezifische Bindungen des Primär- oder Sekundärantikörpers zu verhindern, wurden die Schnitte anschließend für 60 Minuten mit einer 10% Pferdeserum (*Horse serum* =HS) Lösung in PBS geblockt:

- In Küvette mit VE waschen
- 20 min Methanol (98ml) + H₂O₂ (2ml 30%ig) inkubieren
- 5x in Küvette mit VE waschen
- Hydrophobe Barriere mit „*PAP pen immunostaining*“ auftragen
- 2 min mit PBS auf OT waschen
- Block: 10% *Horse Serum* (100% HS + PBS) in PBS für mindestens 60 min
- 1 min mit TBST auf OT waschen

Die Inkubation mit dem Primärantikörper „*Polyclonal Antibody to CD274*“ (Acris) erfolgte bei 4°C über Nacht mit einer Verdünnung von 1:400 in 1% Pferdeserum in PBS. Vor dem Auftragen des Sekundärantikörpers wurden die Schnitte zwei Mal je 5 min mit TBST gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein „*anti-rabbit IgG-HRP*“ (Cell Signaling

Technology) mit einer Verdünnung von 1:160 in TBST für 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) auf die Schnitte gegeben.

Zum Nachweis wurde die Avidin-Biotin-Methode unter Verwendung des *Vectastain ABC Peroxidase Kit rabbit* (Vector Laboratories Inc., PK-4001) genutzt. Mit diesem ABC-Mix wurden die Schnitte 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

- Während der Inkubation mit dem Sekundärantikörper den ABC-Mix mit *Vectastain ABC Peroxidase Kit rabbit* (Vector Laboratories Inc., PK-4001) vorbereiten:
1:100 Reagenz A + 1:100 Reagenz B + TBST
➔ muss vor Benutzung 30 min bei RT inkubieren
- 5 min mit TBST auf OT waschen.
- 5 min mit TBST in Küvette waschen.
- Je 100µl ABC-Mix auf OT, 40 min bei RT inkubieren
- 5 min mit TBST auf OT waschen.
- 5 min mit TBST in Küvette waschen

Für die Detektion wurde das *NovaRED Peroxidase (HRP) Substrate Kit* (Vector Laboratories Inc., SK-4800) nach Herstellerangaben eingesetzt und die Präparate für etwa 10 Minuten (unter Sichtkontrolle) damit inkubiert. Zur besseren mikroskopischen Beurteilbarkeit wurde zusätzlich eine Kernfärbung mit Hämalaun (= Hämatoxylin, Tabelle 3) für 50 Sekunden mit anschließendem Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min durchgeführt.

Detektion:

- Je 100µl pro Schnitt 10 min bei RT inkubieren mit „*NovaRED Peroxidase (HRP) Substrate Kit*“ (Vector Laboratories Inc., SK-4800): Reagenz 1 1:76 + Reagenz 2 1:81+ Reagenz 3 1:81 + H₂O₂ 1:76 + HPLC-H₂O
- 5 min mit VE auf OT waschen
- 5 min mit VE in Küvette waschen
- 50 s in Hämalaun bei RT inkubieren
- 10 min Bläuen in leicht fließendem, kaltem Leitungswasser (kein entsalztes/kalkfreies Wasser, da leicht basischer pH-Wert erforderlich ist)

Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert und mit Hilfe eines Eindeckmediums (Roti®-Histokitt II, Tabelle 3) und Deckgläschen luftdicht abgeschlossen.

Dehydrieren:

- 1x 1min 70% Ethanol
- 2x 1min 96% Ethanol
- 2x 1min 100% Ethanol
- 2x 3min Xylol
- Eindeckeln mit Roti®-Histokitt II und aushärten lassen (im Abzug)

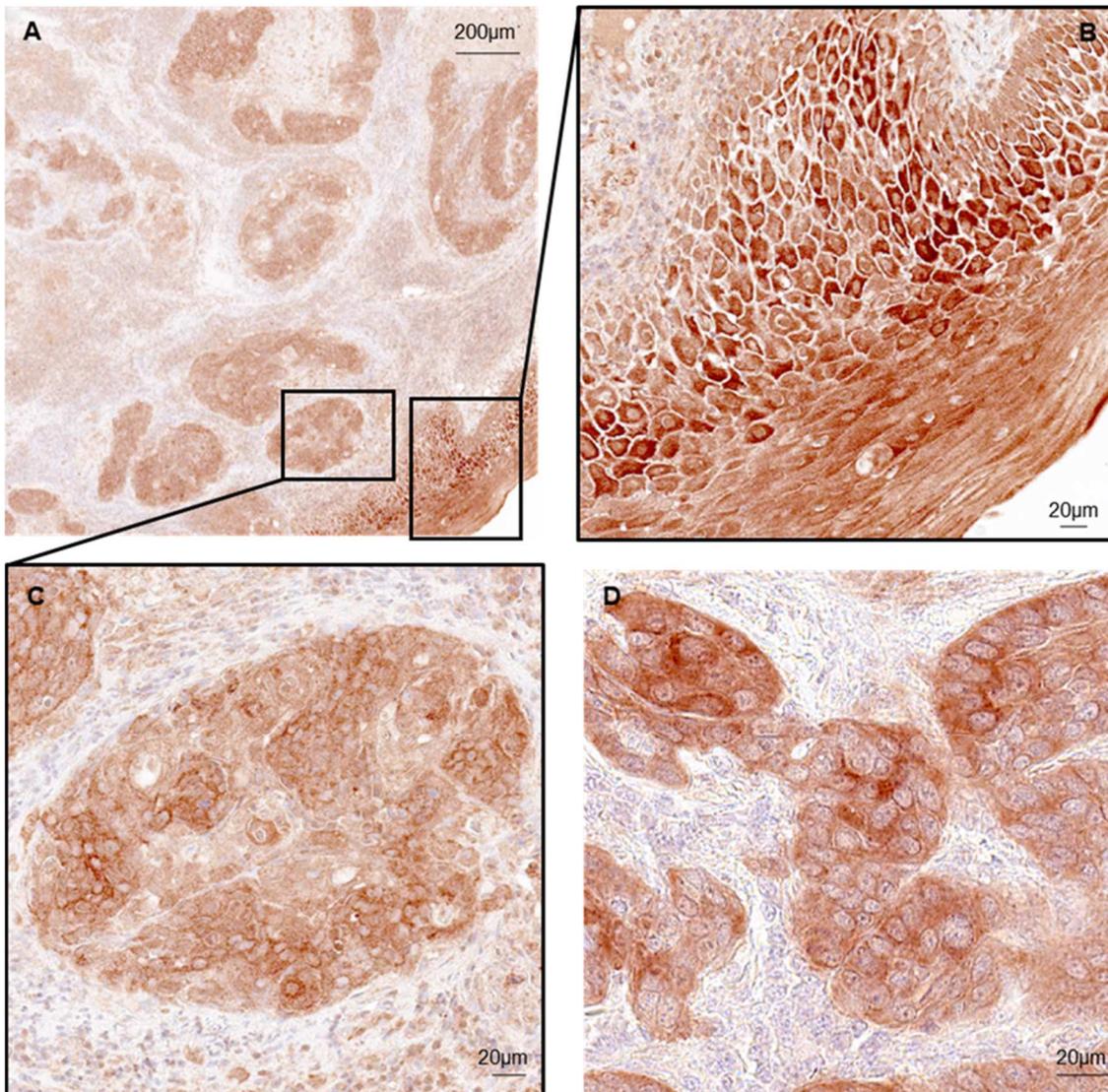


Abbildung 2: PD-L1 Expression in OPSCC im IHC Vorversuch. FFPE Flächenschnitte wurden mit Hilfe eines anti-PD-L1 Antikörpers (Polyclonal Antibody to CD274, Acris) immunhistochemisch (rot) und Hämatoxylin (blaue Kernfärbung) angefärbt. A-D: repräsentative Beispiele der Färbung. **A:** Übersichtsaufnahme; **B:** unspezifische Färbung des Epithels; **C:** randständige Färbung von Zellen in Tumornestern; **D:** unspezifische Zellfärbung von Tumorzellen.

Abbildung 2 zeigt exemplarisch die PD-L1 Expression in OPSCC im IHC Vorversuch. Neben der randständigen Färbung von Tumorzellen (Abbildung 2C) zeigt sich jedoch ebenfalls eine unspezifische Färbung des Epithels (Abbildung 2A und B) und Zellfärbung von Tumorzellen (Abbildung 2D). Auf Grund dieser zum Großteil unspezifischen Färbung war der Vorversuch nicht auswertbar. Daher wurden die Proben von externen Kooperationspartnern (Abschnitt 2.5. und 2.6.) mit sowohl validierter Methode als auch validiertem Antikörper gefärbt (2.5.). Die im Automaten gefärbten Proben zeigten im Gegensatz zum Vorversuch eine spezifische Färbung und konnten deshalb ausgewertet werden (Abbildung 3, Abbildung 4, Abschnitt 3.2.).

Tabelle 3: Chemikalien, die für die Immunhistochemie (Vorversuch) verwendet wurden.

Chemikalien	Hersteller	Bestell-Nr.
Ethanol absolut	Otto Fischer	27690
H ₂ O ₂	AppliChem	A1134.0250
Hämalaun = Hämatoxylin	Carl Roth	T865.1
HCl	Sigma	H1758
<i>Horse Serum</i> (HS) 100%	Santa Cruz Biotechnology, inc.	sc-2483
KCl	AppliChem	A2939.1000
KH ₂ PO ₄	AppliChem	A1043.0500
Methanol	AppliChem	A3493
Na ₂ HPO ₄	AppliChem	A2944.0500
NaCl	AppliChem	A2942.1000
<i>Target Retrieval Solutions</i> (pH6)	DAKO	S169984
Tris	AppliChem	A3452.1000
Tween 20	AppliChem	A4974.0250
Xylol	Carl Roth	CN80.1
Roti®-Histokitt II	Carl Roth	6638.1
HLPC H ₂ O	Sigma	34877

Tabelle 4: Puffer, die für die Immunhistochemie (Vorversuch) verwendet wurden.

Puffer	Chemikalien	Menge	Hersteller	pH-Wert
PBS 10x	NaCl	80g	AppliChem	7,4
	Na ₂ HPO ₄	7,2g	AppliChem	
	KCl	2g	AppliChem	
	KH ₂ PO ₄	4,8g	AppliChem	
	H ₂ O	1l		
TBS 10x	HCl	mit HCl titrieren	AppliChem	7,4
	NaCl	40g	AppliChem	
	Tris	12,1g	AppliChem	
	H ₂ O	500ml		
TBST	TBS 10x	50ml		
	Tween 20	500µl	AppliChem	
	H ₂ O	500ml		

Tabelle 5: Geräte, die für die Immunhistochemie (Vorversuch) verwendet wurden.

Geräte		Hersteller	Modell-Nr.
Mikroskop	DMI3000B	Leica	11888380
Mikrowelle	R-240W	Sharp	100701064
Schüttler	Mini Blot Mixer	VWR	95057-436
Vortexer	Lab dancer	IKA	3365000
Zentrifuge	Sprout	Heathrow Scientific LLC	120301
PAP pen immunostaining	Z672548-1EA	Sigma-Aldrich	1001419477
Trockenschrank		Binder	ED53
Laborabzug		Wesemann	

2.5. Immunhistochemie im Färbeautomaten

Die ausgewählten OPSCC Flächenschnitte und TMA wurden durch Mitarbeitende des Instituts für Pathologie der Uniklinik Köln unter der Leitung von Prof. Dr. med Alexander Quaas gefärbt. Dazu wurde der Färbeautomat *Bond Max automated system* (Leica) eingesetzt. Zur Detektion von PD-L1 wurde der Antikörper „*PD-L1 IHC 28-8 pharmDx*“ (Dako) mit einer Verdünnung von 1:100 nach Herstellerangaben verwendet. Im Automaten wurden dabei prinzipiell dieselben Schritte wie im Vorversuch, nur automatisiert und mit angepassten Zeiten und Chemikalienmengen durchgeführt. Als

Positivkontrolle diente dabei normales Tonsillengewebe bei jedem Färbedurchgang (Wuerdemann et al. 2020).

2.6. Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung wurde durch zwei bzw. drei verblindete Untersucher (darunter Prof. Dr. Sibel Gültekin, Abteilung für Oralpathologie der Fakultät für Zahnheilkunde der Gazi Universität Ankara, Türkei) durchgeführt, die ihre Ergebnisse am Ende verglichen (Wuerdemann et al. 2020). Die OPSCC Gewebeschnitte wurden anhand eines prozentualen Scores in verschiedene Expressionsklassen (0%, $\geq 1\%$, $\geq 5\%$, $\geq 10\%$, $\geq 25\%$, $\geq 50\%$) eingeteilt (Abbildung 4, Abschnitt 3.2.). Es wurden jedoch nur Zellen mit einer kompletten randständigen Färbung als positiv-gefärbt gewertet. Dabei wurde die Zahl der gefärbten Tumorzellen in Relation zu allen Tumorzellen gesetzt. Als positive PD-L1 Expression wurde für die dichotomisierte Auswertung eine Färbung von $\geq 1\%$ der Tumorzellen gewertet.

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der IHC Färbung und der Patientendaten erfolgte mit Hilfe von IBM SPSS Statistics 24 und MS-Excel 2016. Die rekursive Partitionierung erfolgte unter Verwendung der Funktion „ctree“ (*conditional inference trees*) mit dem Testtyp „Bonferroni“ in R (Version 3.2.3) mit dem Zusatzpaket „partykit“ (Version 1.0–5) (Hothorn und Zeileis 2015).

Für die Statistik wurde der Pearson Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Dabei wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

Die Analysen des Gesamtüberlebens in Bezug auf den HPV-Status und die PD-L1 Expression wurden mit Hilfe des Kaplan-Meier-Verfahrens durchgeführt. Dabei werden die aufgetretenen Ereignisse (Tod des Patienten) über die Zeit aufgetragen und die Überlebensrate für jeden Zeitpunkt grafisch dargestellt. Die so entstandenen Kurven wurden mit einem Log-rank-Test miteinander verglichen. Bei dieser univariaten Analyse wurde zudem die „Hazard Ratio“ (HR) mit Hilfe der univariaten Cox-Regression berechnet. Diese HR gibt die Sterberate der einen Gruppe im Vergleich zur Referenzgruppe an. Das Konfidenzintervall (CI) für die HR wurde mit einem Niveau von 95% angegeben, was bedeutet, dass der errechnete Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% in diesem CI liegt.

Um den Zusammenhang zwischen mehreren Variablen und deren gemeinsamen Einfluss auf das Überleben darzustellen, wurden zusätzlich zwei verschiedene Arten der multivariaten Analyse durchgeführt. Zuerst wurde eine multivariate Analyse mittels Cox Regression berechnet, wobei hier ebenfalls HR und CI berechnet wurden. Zusätzlich wurde eine rekursive Partitionierung angewendet. Mit dieser Form der multivariaten Analyse wird ein Modell erstellt, das eine hierarchische Struktur der Einflussvariablen zeigt. Dabei errechnet das Programm, welche Variable zur größtmöglichen Aufspaltung der Stichprobe hinsichtlich Unterschieden im Gesamtüberleben führt. In den entstehenden Gruppen werden wiederum die verbliebenen Variablen getestet, wodurch eine hierarchische Ordnung der Einflussvariablen entsteht, bis der Unterschied im Gesamtüberleben zu klein für eine weitere Aufspaltung der Gruppen wird und die vorher gewählte p-Wert Grenze erreicht ist. Die hierarchische Ordnung spiegelt sozusagen die Bedeutung der untersuchten Einflussgrößen wider.

3. Ergebnisse

3.1. Tumorcharakteristiken und Risikofaktoren der untersuchten OPSCC in Hinblick auf den HPV-Status

Von den zwischen 2000 bis 2017 diagnostizierten und in Gießen behandelten OPSCC wurden 278 Tumorproben mittels Immunhistochemie auf PD-L1 untersucht. Dies ist die im Folgenden beschriebene Stichprobe. Die Tumorcharakteristika, Lebensstil und Risikofaktoren der Patienten sind Tabelle 6 dargestellt. 33,9% der Karzinome sind im Vorfeld dieser Untersuchung als HPV-getrieben identifiziert worden (Abschnitt 2.3.). Wie in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe und der Literatur bereits beschrieben, unterscheidet sich auch in dieser Stichprobe die Gruppe der HPV-negativen in einigen Aspekten signifikant von der Gruppe der HPV-getriebenen Tumoren (Wagner et al. 2016; Elrefaey et al. 2014). So zeigen die HPV-getriebene OPSCC der Stichprobe signifikant seltener (27,6% vs. 72,4%) ein fortgeschrittenes Tumorstadium (T3-4). Im Gegensatz dazu wird signifikant häufiger eine lymphogene Metastasierung nachgewiesen. In Bezug auf den Lebensstil der Patienten mit OPSCC lässt sich erkennen, dass HPV-getriebene Karzinome signifikant öfter bei Nichtrauchern und Nichttrinkern auftreten. Hinsichtlich UICC-Stadium (UICC7), Fernmetastasierung (M), Gesundheitszustand (ECOG-Stadium), Alter und Geschlecht zeigen sich in dieser Stichprobe keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC (Tabelle 6).

Tabelle 6: Tumorcharakteristiken und Risikofaktoren der untersuchten OPSCCs (n=278) in Hinblick auf den HPV-Status.

Tumorcharakteristik		Alle		HPV-negativ		HPV-getrieben		p
		n=278	%	n=183	%	n=94	%	
HPV	negativ	183	66,1					
	getrieben	94	33,9					
UICC7	früh	95	34,5	58	61,1	37	38,9	0,238
	fortgeschritten	180	65,5	122	68,2	57	31,8	
T-Kategorie	T1-2	147	53,6	88	59,9	59	40,1	0,029
	T3-4	127	46,4	92	72,4	35	27,6	
N-Kategorie	N0	61	22,3	49	80,3	12	19,7	0,006
	N>0	212	77,7	129	61,1	82	38,9	
M-Kategorie	M0	252	94,0	166	66,1	85	33,9	0,830
	M>0	16	6,0	11	68,8	5	31,3	
Risikofaktoren								
Nikotin	nein	54	19,8	15	28,3	38	71,7	<0,001
	ja	219	80,2	166	75,8	53	24,2	
Alkohol	nein	104	47,1	45	43,7	58	56,3	<0,001
	ja	117	52,9	105	89,7	12	10,3	
Alter	Jung (<60)	131	47,1	89	68,5	41	31,5	0,428
	Alt (≥60)	147	52,9	94	63,9	53	36,1	
Geschlecht	weiblich	63	22,7	37	59,7	25	40,3	0,228
	männlich	215	77,3	146	67,9	69	32,1	
ECOG	gesund (0-1)	194	70,0	127	65,8	66	34,2	0,788
	krank (2-4)	83	30,0	56	67,5	27	32,5	

*p: Pearson Chi-Quadrat-Test, signifikante p-Werte ($\leq 0,05$) fett gedruckt.

3.2. PD-L1 Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen der untersuchten OPSCC

Von den Gewebeproben der untersuchten Stichprobe (n=278) zeigten mit Hilfe des Antikörpers „PD-L1 IHC 28-8 pharmDx“ (Dako) 106 Proben eine deutliche PD-L1 Expression ($\geq 1\%$ positive Tumorzellen). Abbildung 3 zeigt exemplarisch die randständige PD-L1 Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen nach immun-histochemischer Färbung eines der untersuchten OPSCC-Präparate, die als positiv gewertet wurde. Die verschiedenen Expressionsklassen (0%, $\geq 1\%$, $\geq 5\%$, $\geq 10\%$, $\geq 25\%$, $\geq 50\%$) sind in Abbildung 4 durch repräsentative Beispiele dargestellt. Als positive PD-L1 Expression für die dichotomisierte Auswertung wurde eine Färbung von $\geq 1\%$ der Tumorzellen gewertet.

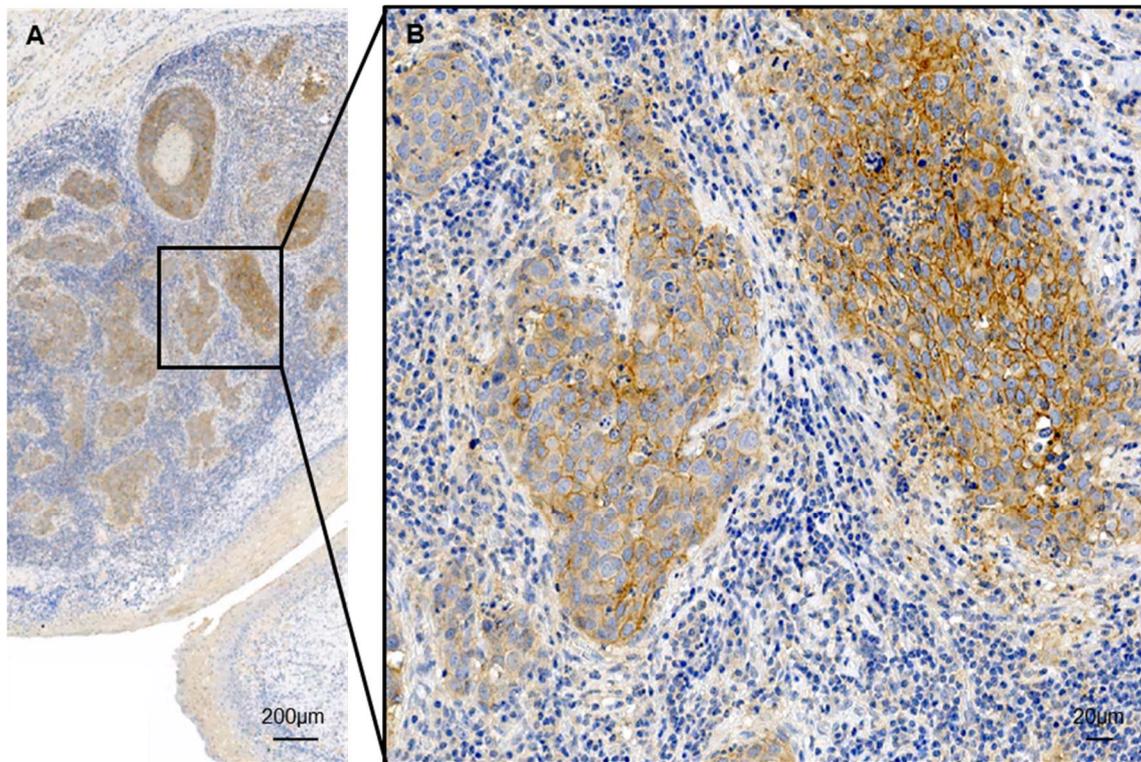


Abbildung 3: PD-L1 Expression bei $\geq 50\%$ der Tumorzellen auf einem OPSCC Flächenschnitt. FFPE Flächenschnitt, mit Hilfe eines anti-PD-L1 Antikörpers (*PD-L1 IHC 28-8 pharmDx*, Dako) immunhistochemisch (braun) und mit Hämatoxylin (blaue Kernfärbung) angefärbt. **A:** Übersichtsaufnahme. **B:** Ausschnittvergrößerung. Die randständige Färbung der Tumorzellen zeigt die Expression von PD-L1 auf der Zelloberfläche.

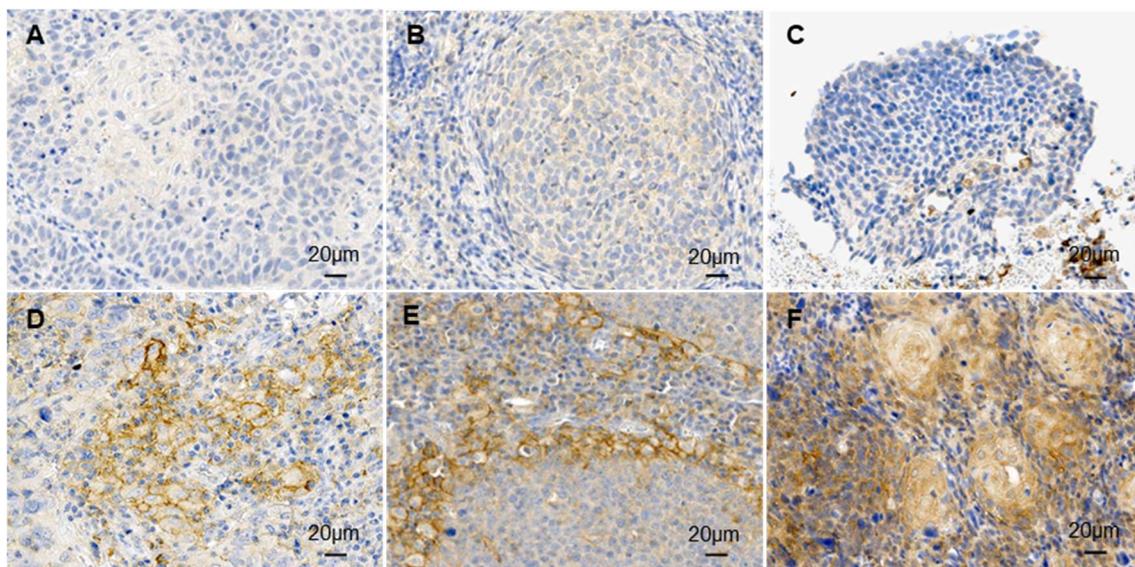


Abbildung 4: PD-L1 Expression in OPSCC. FFPE Flächenschnitte wurden mit Hilfe eines anti-PD-L1 Antikörpers (*PD-L1 IHC 28-8 pharmDx*, Dako) immunhistochemisch (braun) und mit Hämatoxylin (blaue Kernfärbung) angefärbt. A-F: repräsentative Beispiele der ausgewerteten Expressionsklassen. **A:** 0%; **B:** $\geq 1\%$; **C:** $\geq 5\%$; **D:** $\geq 10\%$; **E:** $\geq 25\%$ und **F:** $\geq 50\%$ PD-L1 Expression.

Tabelle 7 stellt Tumorcharakteristika, Lebensstil und Risikofaktoren der Patienten in Bezug auf die PD-L1 Expression dar. Man erkennt, dass die HPV-getriebenen OPSCC signifikant häufiger PD-L1 exprimieren (51,1% vs. 31,7%). Zudem tritt eine PD-L1 Expression signifikant öfter bei Nichtrauchern (61,1% vs. 33,3%) und Nichttrinkern (50,0% vs. 29,9%) auf. Des Weiteren zeigt sich deutlich häufiger eine Expression bei älteren Patienten (>60Jahre). In Bezug auf die Faktoren UICC-Stadium, TNM-Stadium, Gesundheitszustand (ECOG-Stadium) und Geschlecht lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der PD-L1 Expression nachweisen.

Tabelle 7: PD-L1 Expression von Tumorzellen in OPSCC Gewebeschnitten.

Tumorcharakteristik	PD-L1 Expression*				p	
	PD-L1 neg		PD-L1 pos			
	n=172	%	n=106	%		
HPV	negativ	125	68,3	58	31,7	0,002
	getrieben	46	48,9	48	51,1	
UICC7	früh	60	62,5	36	37,5	0,673
	fortgeschritten	109	60,6	71	39,4	
T-Kategorie	T1-2	93	62,8	55	37,2	0,611
	T3-4	76	59,8	51	40,2	
N-Kategorie	N0	40	65,6	21	34,4	0,423
	N>0	127	59,9	85	40,1	
M-Kategorie	M0	154	61,1	98	38,9	0,912
	M>0	10	62,5	6	37,5	
Risikofaktoren						
Nikotin	nein	21	38,9	33	61,1	<0,001
	ja	146	66,7	73	33,3	
Alkohol	nein	52	50,0	52	50,0	0,002
	ja	82	70,1	35	29,9	
Alter	Jung (<60)	89	67,9	42	32,1	0,049
	Alt (≥60)	83	56,5	64	43,5	
Geschlecht	weiblich	37	58,7	26	41,3	0,560
	männlich	135	62,8	80	37,2	
ECOG	gesund (0-1)	118	60,8	76	39,2	0,634
	krank (2-4)	53	63,9	30	36,1	

*: PD-L1 Expression auf FFPE Gewebeproben nachgewiesen mit Hilfe des Antikörpers „PD-L1 IHC 28-8 pharmDx“ (Dako). PD-L1 negativ: Expression 0%, PD-L1 positiv: Expression ≥ 1%. p: Pearson Chi-Quadrat-Test, signifikante p-Werte (≤ 0,05) fett gedruckt.

Da Nikotinabusus bei HPV-negativen OPSCC einen großen Risikofaktor darstellt, wurde für diese Tumoren die PD-L1 Expression in Bezug auf Rauchen/Nichtrauchen untersucht (Abbildung 5A). Dabei konnte festgestellt werden, dass HPV-negative OPSCC von Nichtrauchern signifikant häufiger PD-L1 exprimieren ($p=0,015$). Bei HPV-getriebenen OPSCC sieht die Verteilung ähnlich aus, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied in der PD-L1 Expression zwischen Tumoren von Nichtrauchern und Rauchern festgestellt werden (Abbildung 5B).

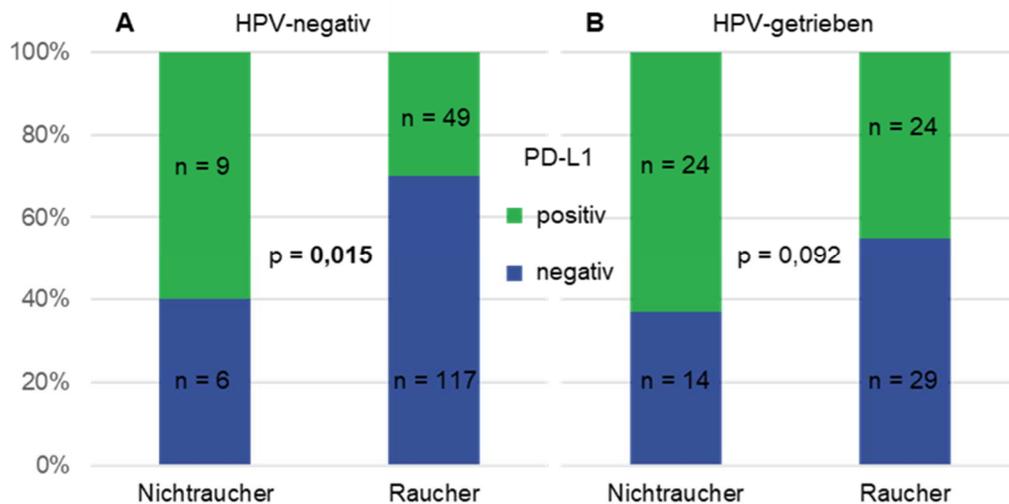


Abbildung 5: PD-L1 Expression in Bezug auf den Nikotinabusus. A: in HPV-negativen OPSCC; **B:** in HPV-getriebenen OPSCC. p: Pearson Chi-Quadrat-Test, signifikante p-Werte ($\leq 0,05$) fett gedruckt.

3.3. Univariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit OPSCC

Für die Betrachtung des Gesamtüberlebens in dieser Stichprobe wurden nur Fälle ohne Fernmetastasierung (Stadium M0) ausgewählt, da diese Patienten einem kurativen Therapieansatz zugeführt wurden. Das Gesamtüberleben in Bezug auf den HPV-Status, die PD-L1 Expression, die T-Kategorie und das ECOG-Stadium ist in Abbildung 6 dargestellt. Patienten mit HPV-getriebenen OPSCC haben ein signifikant höheres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativen OPSCC ($p \leq 0,001$). Bei PD-L1 Expression beträgt das 5-Jahres-Überleben (5JÜ) 62,2% im Gegensatz zu 44,9% beim Fehlen von PD-L1 auf der Tumoroberfläche. Waren die Tumoren bei Diagnose klein (T1-2) so haben diese Patienten eine signifikant höhere Überlebenschance als Patienten mit großen Tumoren (T3-4). Zudem zeigt sich auch, dass bei gutem Gesundheitszustand (ECOG 0-1) ein deutlich höheres 5JÜ von 61,4% gegenüber 23,4% bei ECOG-Stadium 2-4 besteht.

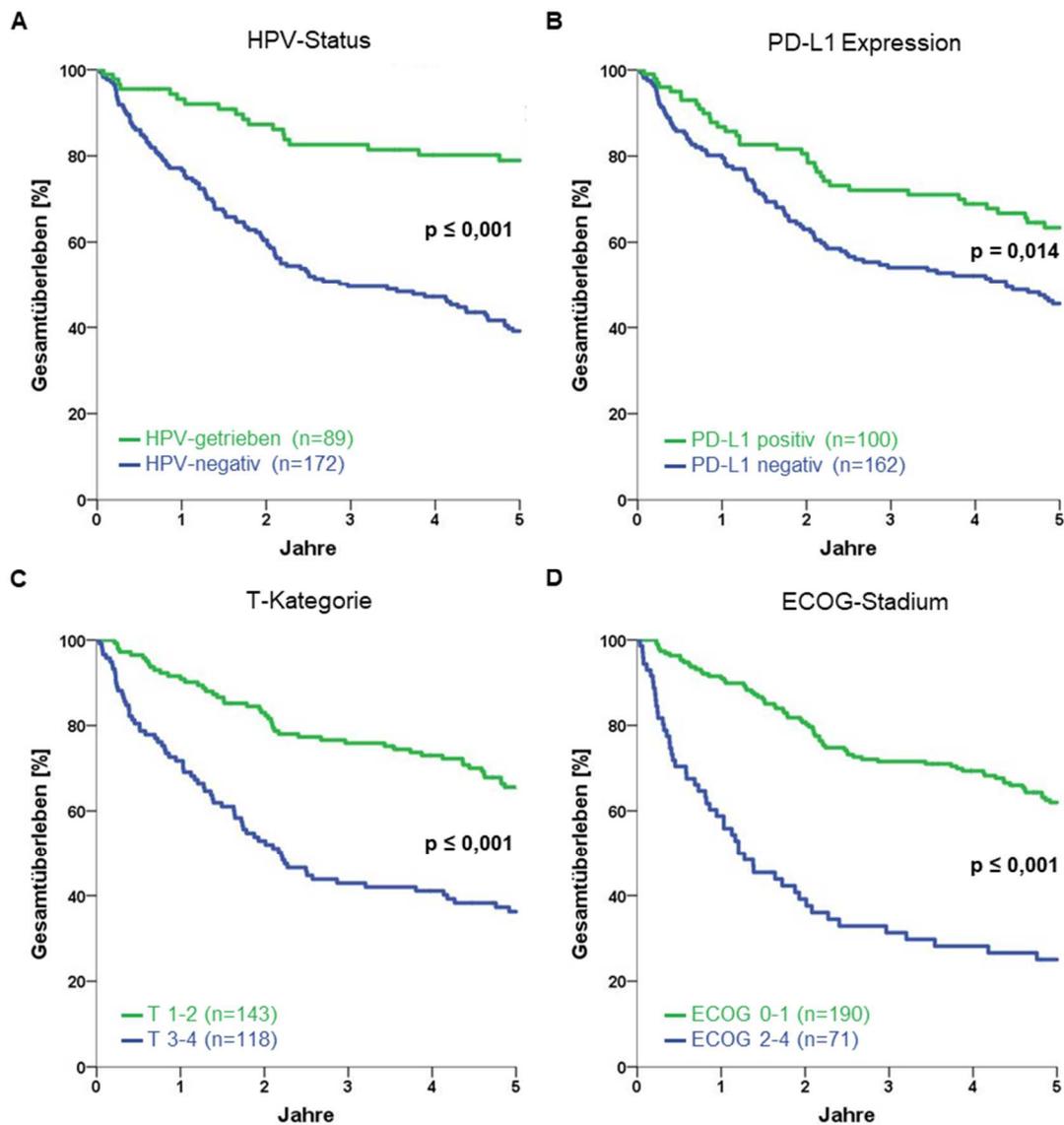


Abbildung 6: Gesamtüberleben der Patienten mit OPSCC nach Kaplan-Meier. Patienten im Stadium M0. Die Stratifizierung erfolgte nach: **A:** HPV-Status; **B:** PD-L1 Expression; **C:** T-Kategorie; **D:** ECOG-Stadium. p: log-Rank-Test, signifikante p-Werte ($\leq 0,05$) fett gedruckt.

Betrachtet man Patienten mit (Abbildung 7A) bzw. ohne PD-L1 Expression (Abbildung 7B) stratifiziert nach dem HPV-Status, zeigen Patienten mit HPV-getriebenen Tumoren ein signifikant besseres Gesamtüberleben in beiden Gruppen mit unterschiedlicher PD-L1 Expression. Bei den Patienten mit HPV-negativen OPSCC haben Patienten mit PD-L1 Expression ein signifikant ($p=0,043$) besseres Gesamtüberleben (Abbildung 7C). Dieser Effekt in Abhängigkeit von der PD-L1 Expression zeigt sich in der Gruppe der HPV-getriebenen OPSCC nicht (Abbildung 7D).

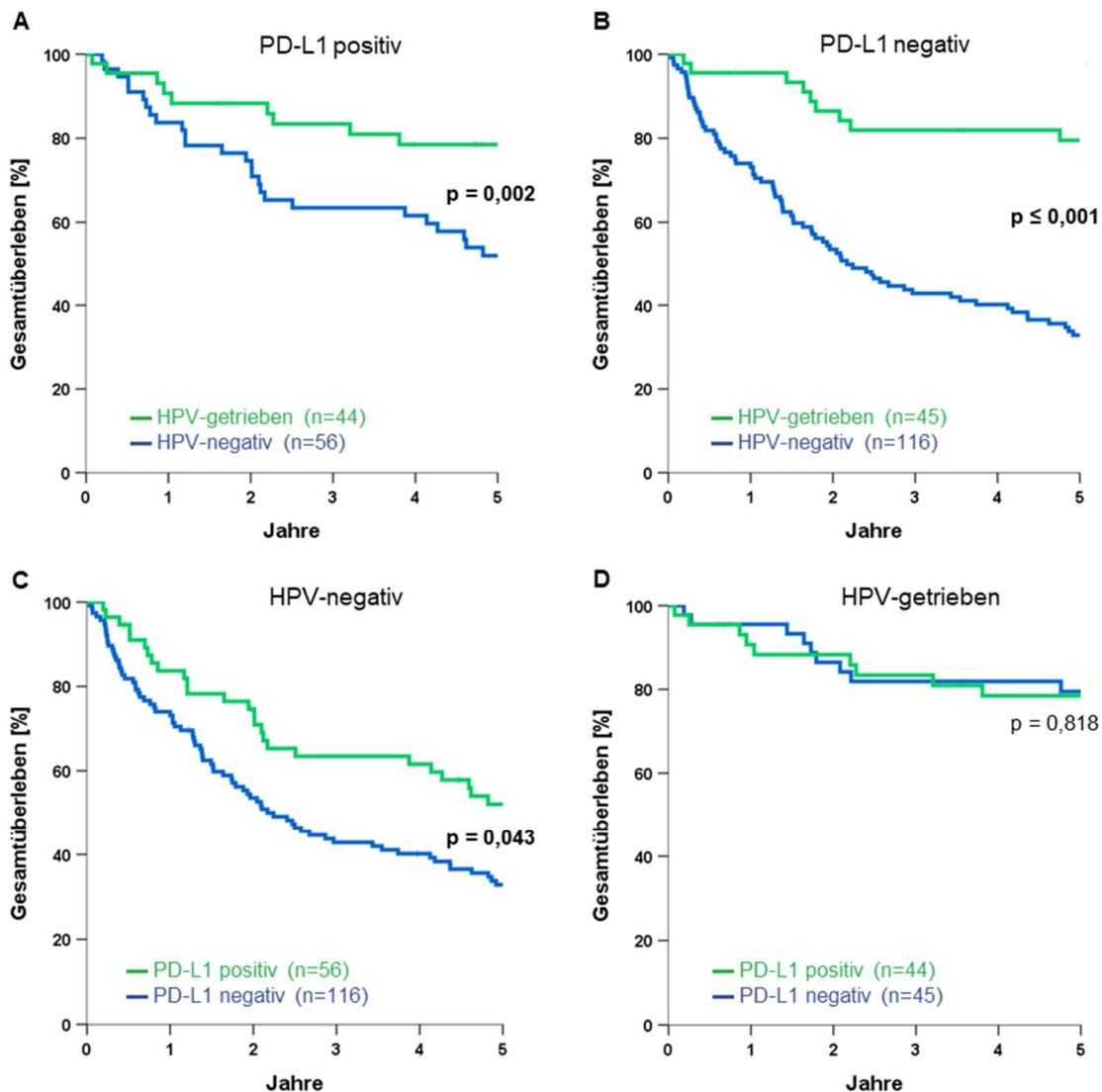


Abbildung 7: Gesamtüberleben der Patienten mit OPSCC nach Kaplan-Meier. Patienten im Stadium M0. **A:** PD-L1 positive (Expression $\geq 1\%$) OPSCC stratifiziert nach HPV-Status; **B:** PD-L1 negative (Expression $< 1\%$) stratifiziert nach HPV-Status; **C:** HPV-negative OPSCC stratifiziert nach PD-L1 Expression; **D:** HPV-getriebene OPSCC stratifiziert nach PD-L1 Expression. p: log-Rank-Test, signifikante p-Werte ($\leq 0,05$) fett gedruckt.

In der univariaten Analyse des Überlebens der Patienten mittels Cox Regression (Tabelle 8) zeigt der HPV-Status den größten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Patienten mit einem HPV-negativen OPSCC haben ein 3,26-fach höheres Risiko zu versterben als Patienten mit einem HPV-getriebenen Tumor (Hazard Ratio, HR=0,307). Durch eine PD-L1 Expression reduziert sich das Risiko zu versterben auf 66% (HR=0,66; $p=0,015$) im Vergleich zu OPSCC ohne PD-L1 Expression. Zudem zeigen die Variablen UICC7, T-Kategorie, Nikotin- und Alkoholkonsum und Alter einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten. Ein schlechter Gesundheitszustand der

Patienten (ECOG 2-4) stellt einen großen negativen Faktor für das Überleben (HR=2,73) dar.

Tabelle 8: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit OPSCC.

		univariate Überlebensanalyse				Cox Regression			
		Median OS	S.d.	5-JÜ	p-Wert	HR	95CI		p-Wert
		(Jahre)		(%)	(log-rank)		unteres	oberes	(Cox)
		n							
Alle*		262	5,59	0,45	51,9				
Tumorcharakteristik									
HPV	negativ	172	2,96	0,79	38,5	<0,001	1		
	getrieben	89	n.d.	n.d.	77,5		0,307	0,21	0,46
PD-L1	negativ	162	4,37	0,93	44,9	0,014	1		
	positiv	100	7,15	1,66	62,2		0,660	0,47	0,92
UICC7	1-3	95	7,63	2,40	65,0	0,007	1		
	4	199	4,12	0,98	43,9		1,583	1,13	2,21
T-Kategorie	T1-2	143	8,60	2,00	64,8	<0,001	1		
	T3-4	118	2,20	0,33	35,2		2,260	1,65	3,09
N-Kategorie	N0	60	5,21	0,48	49,8	0,978	1		
	N>0	199	5,32	0,63	52,3		0,995	0,69	1,43
Risikofaktoren									
Nikotin	nein	49	10,98	n.d.	57,7	0,009	1		
	ja	209	5,13	0,44	49,5		1,850	1,16	2,96
Alkohol	nein	98	16,13	6,03	66,2	<0,001	1		
	ja	111	3,87	1,03	39,5		2,262	1,56	3,28
Alter	Jung (<60)	126	8,60	1,87	59,7	0,001	1		
	Alt (≥60)	136	4,14	1,02	43,8		1,719	1,26	2,36
Geschlecht	weiblich	61	5,26	1,21	52,0	0,987	1		
	männlich	201	5,40	0,52	51,2		1,003	6,89	1,46
ECOG	0-1	190	7,01	1,13	61,4	<0,001	1		
	2-4	71	1,21	0,31	23,4		2,726	1,96	3,79

*: Patienten mit OPSCC ohne Fernmetastasierung (M0). Median OS: medianes Gesamtüberleben; S.d.: Standardabweichung; 5JÜ: 5-Jahres-Überleben; 95 CI: 95% Konfidenzintervall; HR: Hazard Ratio; n.d.: *not determined* = nicht ermittelbar, da zu wenige Ereignisse aufgetreten sind; UICC7 1-3: früh; UICC7 4: fortgeschritten. Signifikante p-Werte ($\leq 0,05$) fett gedruckt.

3.4. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit OPSCC mittels Cox Regression

Zur Betrachtung der verschiedenen Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben der Patienten mit OPSCC wurde eine multivariate Analyse mittels Cox Regression durchgeführt (Tabelle 9). In dieses Modell gingen alle dichotomisierten Variablen aus der univariaten Analyse (Tabelle 8) ein, die „inhaltlich“ voneinander unabhängig sind (HPV-Status, PD-L1 Expression, T-Kategorie, N-Kategorie, Nikotinkonsum, Alkoholkonsum, Alter, Geschlecht, ECOG-Stadium) und von denen auf Grund von Literaturdaten ein

signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben angenommen wird (Fakhry et al. 2008). Mit Hilfe von T-, N- und M-Kategorie wird das UICC-Stadium gebildet, daher ist es nicht unabhängig und wurde nicht mit einbezogen. In die Analyse wurden nur Patienten ohne Fernmetastasen (Stadium M0) und mit vollständigen Daten in Bezug auf die betrachteten Variablen eingeschlossen.

Tabelle 9: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit OPSCC unter Einbeziehung aller Variablen.

			Cox Regression			
			HR	95% Konfidenzintervall		p-Wert
				unteres	oberes	(Cox)
			n			
Alle*			205			
Tumorcharakteristik						
HPV	negativ	140	1			<0,001
	getrieben	65	0,325	0,178	0,594	
PD-L1	negativ	122	1			0,023
	positiv	83	0,632	0,426	0,938	
T-Kategorie	T1-2	109	1			<0,001
	T3-4	96	2,008	1,36	2,964	
N-Kategorie	N0	42	1			0,161
	N>0	163	0,717	0,45	1,142	
Risikofaktoren						
Nikotin	nein	32	1			0,969
	ja	173	1,016	0,465	2,218	
Alkohol	nein	97	1			0,016
	ja	108	1,646	1,097	2,47	
Alter	Jung (<60)	109	1			0,009
	Alt (≥60)	96	1,610	1,126	2,3	
Geschlecht	weiblich	49	1			0,265
	männlich	156	0,773	0,492	1,216	
ECOG	gesund (0-1)	149	1			<0,001
	krank (2-4)	56	2,862	1,879	4,357	

*: Patienten mit OPSCC ohne Fernmetastasierung (M0) und vollständigen Daten. HR: Hazard Ratio. Signifikante p-Werte ($\leq 0,05$) fett gedruckt.

Nikotinkonsum, das Geschlecht oder eine lymphatische Metastasierung (N-Kategorie) zeigen keinen signifikanten Einfluss ($p > 0,05$) auf das Gesamtüberleben der Patienten in der multivariaten Cox Regression (Tabelle 9). Daher wurden diese Faktoren jeweils einzeln, nacheinander aus dem Modell unter Betrachtung der anderen Faktoren

ausgeschlossen. Hierbei änderten sich die Hazard Ratios und die p-Werte nur geringfügig, sodass man das Modell mit den verbliebenen Variablen als stabil bezeichnen kann (Tabelle 10).

Tabelle 10: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit OPSCC nach Ausschluss der Variablen ohne signifikanten Einfluss.

			HR	Cox Regression 95% Konfidenzintervall		p-Wert (Cox)
n				unteres	oberes	
Alle*			205			
Tumorcharakteristik						
HPV	negativ	140	1			<0,001
	getrieben	65	0,329	0,193	0,562	
PD-L1	negativ	122	1			0,014
	positiv	83	0,617	0,419	0,908	
T-Kategorie	T1-2	109	1			0,002
	T3-4	96	1,770	1,235	2,536	
Risikofaktoren						
Alkohol	nein	97	1			0,027
	ja	108	1,574	1,054	2,352	
Alter	Jung (<60)	109	1			0,007
	Alt (≥60)	96	1,628	1,141	2,323	
ECOG	gesund (0-1)	149	1			<0,001
	krank (2-4)	56	2,699	1,802	4,043	

*: Patienten mit OPSCC ohne Fernmetastasierung (M0) und vollständigen Daten. HR: Hazard Ratio. Signifikante p-Werte ($\leq 0,05$) fett gedruckt.

Der HPV-Status hat den größten Einfluss auf das Gesamtüberleben, da Patienten mit HPV-negativem OPSCC ein 3,03-fach erhöhtes Sterberisiko haben als Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC (HR=0,329). Die PD-L1 Expression zeigt einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p=0,014$) und reduziert das Risiko zu versterben auf 62% (HR=0,617). T-Kategorie, Alkoholkonsum, Alter und Gesundheitszustand (ECOG-Stadium) haben ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Ein großer Tumor (T3-4) erhöht das Risiko zu versterben auf das 1,77-fache. Ein schlechter Gesundheitszustand (ECOG 2-4) stellt wie auch in der univariaten Überlebensanalyse den größten negativen Faktor mit einem 2,7-fach erhöhten Sterberisiko dar.

Da sich die Stichprobe der HPV-getriebenen OPSCC von der der HPV-negativen signifikant unterscheidet (Tabelle 6, Abschnitt 3.1.), wurde die multivariate Cox Regression zudem für beide Gruppen getrennt durchgeführt.

3.4.1. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit HPV-negativem OPSCC mittels Cox Regression

In das Modell der multivariaten Cox Regression der Patientengruppe mit HPV-negativem OPSCC wurden die Faktoren, die sich in der multivariaten Analyse der gesamten Stichprobe als bedeutsam herausgestellt haben (Tabelle 10) einbezogen. Die PD-L1 Expression zeigt einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p=0,045$). Das Risiko zu versterben sinkt auf 65% ($HR=0,645$), wenn Tumorzellen PD-L1 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Auch in diesem Modell erhöht ein großer Tumor (T3-4) das Sterberisiko ($HR=1,789$). Ein schlechter Gesundheitszustand (ECOG 2-4) hat den größten negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben und hebt das Risiko zu versterben um das 3,25-fache an. Das Alter und Alkoholkonsum zeigen keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Allerdings lässt sich ein Trend in Bezug auf ein erhöhtes Sterberisiko bei Patienten über 60 Jahren erkennen ($HR=1,469$; $p=0,053$).

Tabelle 11: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit HPV-negativem OPSCC.

			n	HR	Cox Regression		p-Wert (Cox)
					unteres	oberes	
Alle*			140				
Tumorcharakteristik							
PD-L1	negativ		92	1			0,045
	positiv		48	0,645	0,420	0,990	
T-Kategorie	T1-2		69	1			0,004
	T3-4		71	1,789	1,204	2,660	
Risikofaktoren							
Alkohol	nein		43	1			0,087
	ja		97	1,468	0,945	2,280	
Alter	Jung (<60)		78	1			0,053
	Alt (≥ 60)		62	1,469	0,995	2,171	
ECOG	gesund (0-1)		104	1			<0,001
	krank (2-4)		36	3,252	2,094	5,051	

*: Patienten mit HPV-negativem OPSCC ohne Fernmetastasierung (M0) und vollständigen Daten. HR: Hazard Ratio. Signifikante p-Werte ($\leq 0,05$) fett gedruckt.

3.4.2. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC mittels Cox Regression

Für die multivariate Cox Regression der Gruppe mit HPV-getriebenen OPSCC (Tabelle 12) wurden dieselben Variablen wie für das Modell der HPV-negativen Gruppe verwendet, um beide Modelle miteinander vergleichen zu können. Die PD-L1 Expression hat in diesem Modell keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Ein höheres Alter (≥ 60) ist die einzige Variable, die einen signifikanten Einfluss auf das Überleben ($p=0,032$) hat und das Risiko zu versterben um das 2,9-fache ($HR=2,924$) erhöht. T-Kategorie, Alkoholkonsum und der allgemeine Gesundheitszustand (ECOG-Stadium) zeigen keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Da es im Beobachtungszeitraum unter den Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC nur zu 20 Ereignissen (Todesfällen) kam, kann dieses Modell jedoch nur mit Einschränkungen betrachtet werden.

Tabelle 12: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC.

			n	HR	Cox Regression		p-Wert (Cox)
					unteres	oberes	
Alle*			65				
Tumorcharakteristik							
PD-L1	negativ		30	1			0,122
	positiv		35	0,477	0,187	1,219	
T-Kategorie	T1-2		40	1			0,131
	T3-4		25	2,259	0,785	6,504	
Risikofaktoren							
Alkohol	nein		54	1			0,154
	ja		11	2,071	0,761	5,636	
Alter	Jung (<60)		31	1			0,032
	Alt (≥ 60)		34	2,924	1,098	7,788	
ECOG	gesund (0-1)		45	1			0,694
	krank (2-4)		20	1,226	0,444	3,386	

*: Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC ohne Fernmetastasierung (M0) und vollständigen Daten. HR: Hazard Ratio. Signifikante p-Werte ($\leq 0,05$) fett gedruckt.

3.5. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit OPSCC mittels rekursiver Partitionierung

Zur Bestimmung der wichtigsten Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben der untersuchten Patienten wurde eine rekursive Partitionierung (RP) durchgeführt (Abbildung 8). In diese Analyse gingen die Variablen HPV-Status, PD-L1 Expression,

UICC-Stadium, TNM-Stadium, Nikotin- und Alkoholkonsum, Alter, Geschlecht und ECOG-Stadium ein, wie sie für die univariate Analyse (Tabelle 8, Abschnitt 3.3.) verwendet wurden. Wie zuvor bei der univariaten Analyse (Abschnitt 3.3.) und bei der multivariaten Analyse mittels Cox Regression (Abschnitt 3.4.) wurden nur Patienten im Stadium M0 in die Analyse eingeschlossen. Die Aufspaltungs- und Endpunkte der RP werden in der Ausgabe des Modells als „Node“ bezeichnet. In dieser multivariaten Modellierung wurde die p-Wert Grenze auf 0,05 festgelegt, die zur Aufspaltung der Patientengruppen in der RP berücksichtigt wurde. Weitere Aufspaltungen, bei denen sich das Gesamtüberleben der resultierenden Gruppen weniger stark unterscheidet, wurden hierdurch in der Modellierung vermieden. Der HPV-Status zeigt sich mit dieser Einstellung der p-Wert Grenze als größter Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben, da er zur ersten Aufspaltung (Node 1) in Untergruppen führt (Abbildung 8). Die nachfolgenden Faktoren sind der Gesundheitszustand (ECOG-Stadium) und die T-Kategorie. Die PD-L1 Expression sowie alle weiteren eingeflossenen Faktoren spielen in diesem Modell mit der gewählten p-Wert Grenze keine Rolle.

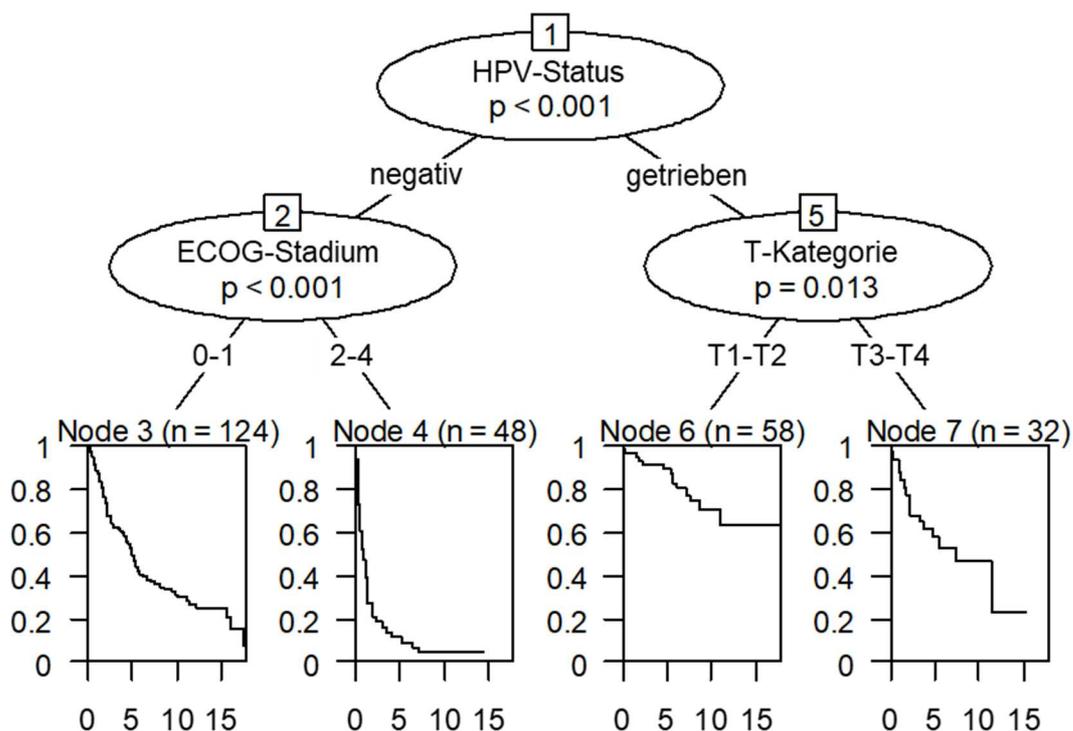


Abbildung 8: Multivariate Modellierung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Überlebenszeit der Patientenstichprobe mittels rekursiver Partitionierung (RP). Einschlusskriterien: alle Patienten der Stichprobe mit OPSCC im Stadium M0 und vollständigen Daten. Verwendete Variablen: HPV-Status, PD-L1 Expression, UICC7, TNM-Stadium, Nikotin, Alkohol, Alter, Geschlecht, ECOG-Stadium. Methode: Bonferroni-Korrektur, p-Wert Grenzen (0,05) für Gruppenteilung, Variablen ohne signifikanten Einfluss gehen nicht in die Abbildung ein. Node 1,2,5: Aufspaltung der Gruppen. Node 3,4,6,7: Endpunkte des Modells.

Durch die Endpunkte (Node 3,4,6,7) des Modells wurden die Patienten in vier Gruppen eingeteilt. Die Überlebensanalyse dieser resultierenden Gruppen ist in Abbildung 9A dargestellt. Das Gesamtüberleben der Patientengruppen Nodes 3 und 7 unterscheidet sich nicht signifikant voneinander, sodass sie zu einer Gruppe zusammengefasst werden konnten. Dadurch konnten die Patienten in drei signifikant unterschiedliche Risikogruppen hinsichtlich des Überlebens eingeteilt werden (Abbildung 9). In der Gruppe mit dem niedrigsten Risiko (HPV-getrieben und T 1-2) beträgt das 5JÜ 88,8% im Gegensatz zu 9,2% in der Gruppe mit dem höchsten Risiko (HPV-negativ, ECOG 2-4). Das Gesamtüberleben beider Gruppen unterscheidet sich signifikant von dem der Patienten mit mittlerem Risiko, deren 5JÜ 50,4% beträgt.

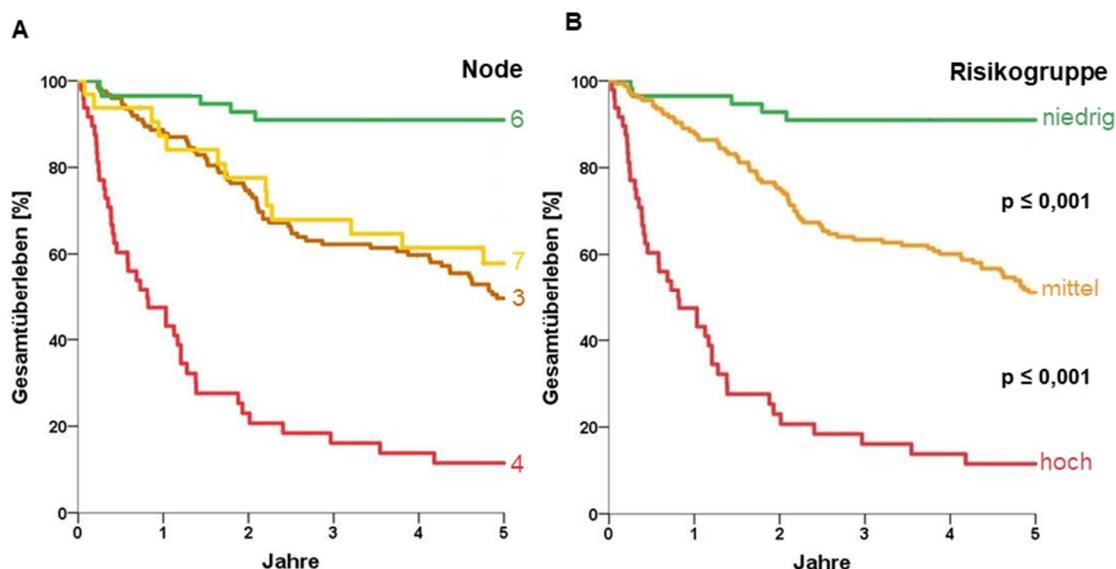


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse aller resultierenden Patientengruppen nach RP. **A:** Gruppeneinteilung durch entstandene Endpunkte der RP; die Patientengruppen sind wie folgt charakterisiert „Node 3“: HPV-negativ, ECOG 0-1; „Node 4“: HPV-negativ, ECOG 2-4; „Node 6“: HPV-getrieben, T 1-2; „Node 7“: HPV-getrieben, T 3-4. **B:** Gruppeneinteilung nach Zusammenfassung der nicht signifikant unterschiedlichen Nodes 3 und 7; Risikogruppe „niedrig“: HPV-getrieben, T 1-2; Risikogruppe „mittel“: HPV-negativ, ECOG 0-1 oder HPV-getrieben, T 3-4; Risikogruppe „hoch“: HPV-negativ, ECOG 2-4. p: log-Rank-Test, signifikante p-Werte ($\leq 0,05$) fett gedruckt.

In Abbildung 10 wird der resultierende Entscheidungsbaum für die Einteilung der Patienten in diese drei Risikogruppen gezeigt. Mit Hilfe dieses Flussdiagramms kann eine individuelle und schnelle Risikoabschätzung für den einzelnen Patienten erfolgen.

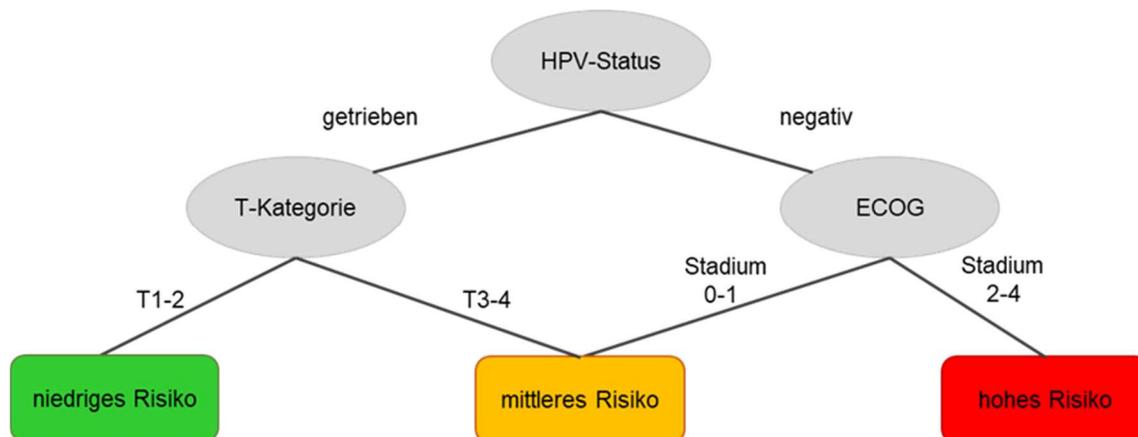


Abbildung 10: Flussdiagramm zur Risikoabschätzung von Patientengruppen mit OPSCC. Die Patientengruppen sind wie folgt charakterisiert „niedriges Risiko“: HPV-getrieben, T 1-2; „mittleres Risiko“: HPV-negativ, ECOG 0-1 oder HPV-getrieben, T 3-4; „hohes Risiko“: HPV-negativ, ECOG 2-4.

Wie bei der multivariaten Analyse mittels Cox Regression (Abschnitt 3.4.) wurden die Untergruppen der Patienten mit HPV-getriebenem und HPV-negativem OPSCC, da sie sich signifikant unterscheiden (Tabelle 6, Abschnitt 3.1.), anschließend getrennt betrachtet.

3.5.1. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit HPV-negativem OPSCC mittels rekursiver Partitionierung

Die multivariate Modellierung von Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben mittels rekursiver Partitionierung wurde für den Teil der Patientenstichprobe mit HPV-negativen OPSCC mit einer p-Wert Grenze von 0,5 durchgeführt, da bei eingeschränkteren Grenzen keine Aufspaltung in der Modellierung erfolgte. Unter dieser Einstellung zeigt der Gesundheitszustand (ECOG-Stadium) den größten Einfluss ($p \leq 0,001$) auf das Gesamtüberleben (Abbildung 11). Die darauffolgenden Faktoren sind Alter der Patienten, T-Kategorie und Alkoholkonsum. Die PD-L1 Expression spielt in diesem Modell mit einer p-Wert Grenze, die mit der Modellierung für HPV-getriebene OPSCC vergleichbar ist, keine Rolle. Auch alle weiteren eingeflossenen Faktoren erscheinen unter der gewählten p-Wert Grenze nicht in der Modellierung.

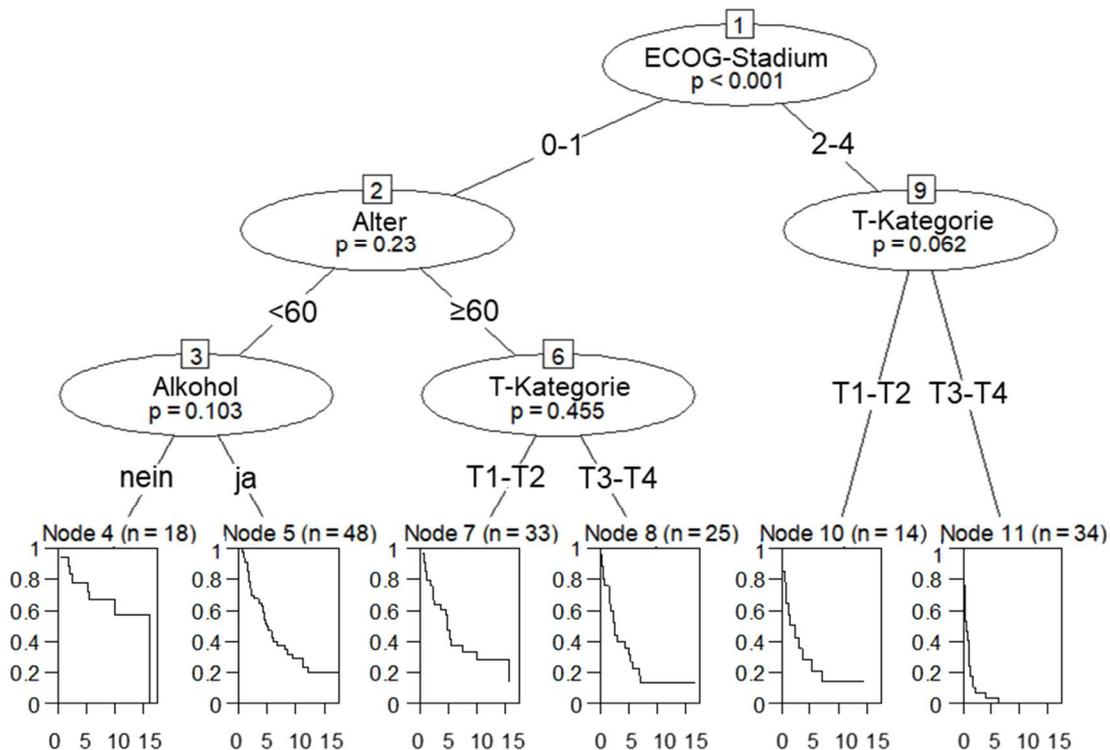


Abbildung 11: Multivariate Modellierung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Überlebenszeit der Patientenstichprobe mit HPV-negativen OPSCC mittels rekursiver Partitionierung (RP). Einschlusskriterien: alle Patienten der Stichprobe mit OPSCC im Stadium M0, HPV-negativ und vollständigen Daten. Verwendete Variablen: PD-L1 Expression, UICC7, TNM-Stadium, Nikotin, Alkohol, Alter, Geschlecht, ECOJ-Stadium. Methode: Bonferroni-Korrektur, p-Wert Grenzen (0,5) für Gruppenteilung, Variablen ohne signifikanten Einfluss gehen nicht in die Abbildung ein. Node 1,2,3,6,9: Aufspaltung der Gruppen. Node 4,5,7,8,10,11: Endpunkte des Modells.

Durch das Modell wurden sechs verschiedene Gruppen gebildet (Abbildung 12A). Diese konnten nach Vergleich der p-Werte (log-Rank-Test) in vier signifikant unterschiedliche Risikogruppen eingeteilt werden (Abbildung 12B). Dafür wurden die Gruppen ohne signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben (Nodes 5 und 7, Nodes 8 und 10) zusammengefasst. Das Gesamtüberleben der vier resultierenden Risikogruppen (niedrig, mittel*1, mittel*2, hoch) unterscheidet sich in allen Kombinationen jeweils signifikant voneinander. Da sich die beiden Patientengruppen mit mittlerem Risiko (mittel*1, mittel*2) signifikant ($p=0,013$) abgrenzen lassen wurden diese nicht weiter zusammengefasst. Bei Patienten der resultierenden Risikogruppe „niedrig“ (ECOJ 0-1, Alter < 60, Alkohol nein) beträgt das 5JÜ 72,2% im Vergleich zur Patientengruppe mit hohem Risiko (ECOJ 2-4, T3-4) mit einem 5JÜ von 3,5%. Das 5JÜ der beiden mittleren Risikogruppe liegt bei 46,5% (mittel*1) bzw. 27,8% (mittel*2).

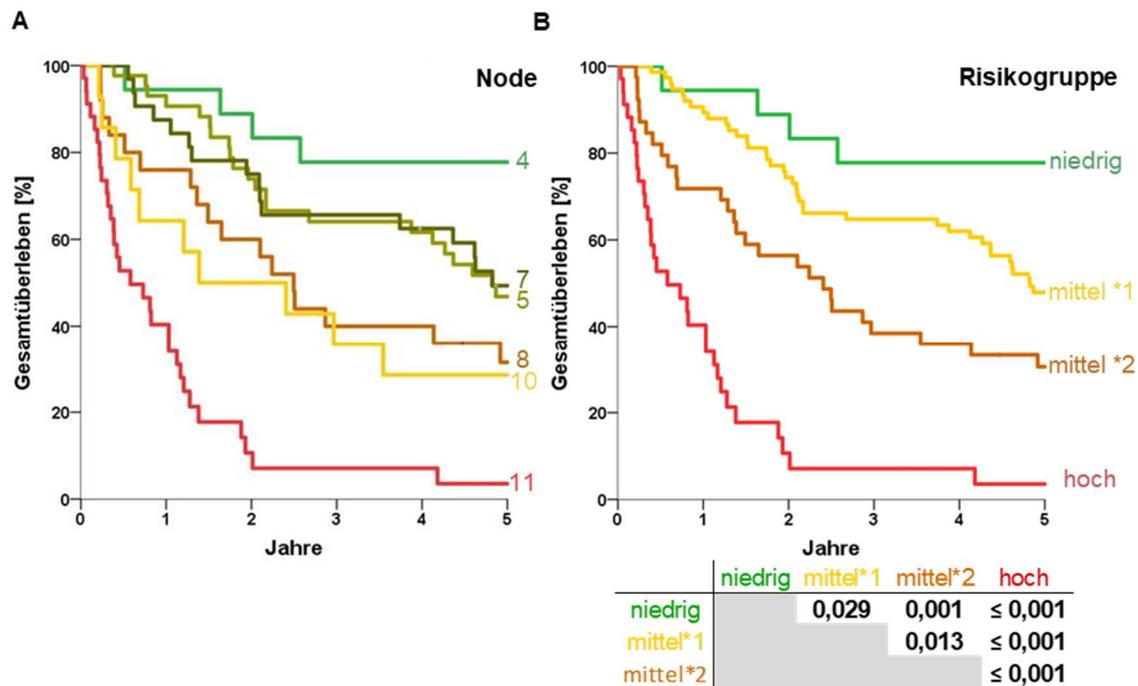


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse aller resultierenden Patientengruppen mit HPV-negativem OPSCC nach RP. A: Gruppeneinteilung durch entstandene Endpunkte der RP; die Patientengruppen sind wie folgt charakterisiert „Node 4“: ECOG 0-1, Alter < 60, Alkohol nein; „Node 5“: ECOG 0-1, Alter < 60, Alkohol ja; „Node 7“: ECOG 0-1, Alter ≥ 60, T1-2; „Node 8“: ECOG 0-1, Alter ≥ 60, T3-4; „Node 10“: ECOG 2-4, T1-2; „Node 11“: ECOG 2-4, T 3-4. **B:** Gruppeneinteilung nach Zusammenfassung der nicht signifikant unterschiedlichen Risikogruppen Nodes 5 und 7 und Nodes 8 und 10; Risikogruppe „niedrig“: ECOG 0-1, Alter < 60, Alkohol nein; Risikogruppe „mittel*1“: ECOG 0-1 Alter < 60, Alkohol ja oder ECOG 0-1, Alter ≥ 60, T1-2; Risikogruppe „mittel*2“: ECOG 0-1, Alter ≥ 60, T3-4 oder ECOG 2-4, T1-2; Risikogruppe „hoch“: ECOG 2-4, T 3-4. p: log-Rank-Test, signifikante p-Werte (≤ 0,05) fett gedruckt.

In Abbildung 13 wird die Einteilung der Patienten mit HPV-negativem OPSCC in die vier zusammengefassten Risikogruppen verdeutlicht.

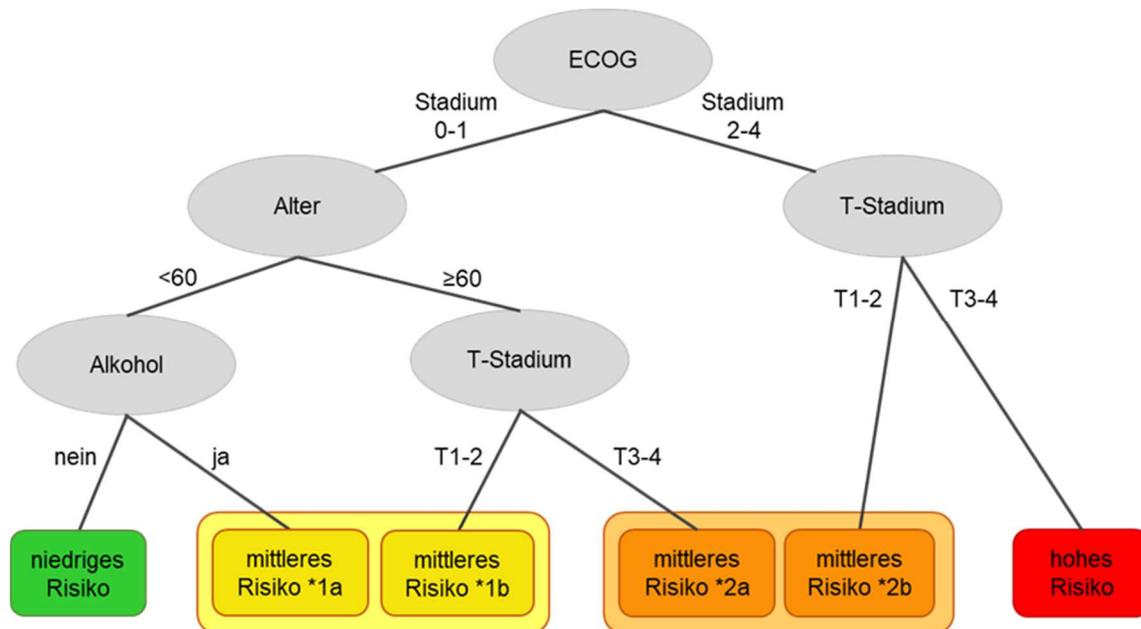


Abbildung 13: Flussdiagramm zur Risikoabschätzung von Patientengruppen mit HPV-negativem OPSCC. Die Patientengruppen sind wie folgt charakterisiert „niedriges Risiko“: ECOG 0-1, Alter < 60, Alkohol nein; „mittleres Risiko *1a“: ECOG 0-1, Alter < 60, Alkohol ja; „mittleres Risiko *1b“: ECOG 0-1, Alter ≥ 60, T1-2; „mittleres Risiko *2a“: ECOG 0-1, Alter ≥ 60, T3-4; „mittleres Risiko *2b“: ECOG 2-4, T1-2; „hohes Risiko“: ECOG 2-4, T 3-4.

3.5.2. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens der untersuchten Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC mittels rekursiver Partitionierung

In der multivariaten Modellierung für die Patientengruppe mit HPV-getriebenen OPSCC wurde eine p-Wert Grenze von 0,5 festgelegt, da unter Verwendung stringenterer Grenzen ebenfalls keine Aufspaltung in der Modellierung erfolgte (Abbildung 14). Hier zeigt die T-Kategorie den größten Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p=0,022$), da sie zur ersten Aufspaltung in Untergruppen führt. Die nächstwichtigen Faktoren sind Alter der Patienten und Expression von PD-L1, wobei jeweils kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben der resultierenden Gruppen besteht. Alle anderen der eingeflossenen Faktoren erscheinen unter der gewählten p-Wert Grenze in der Modellierung nicht. PD-L1 hat somit in dieser Modellierung einen wichtigeren Einfluss als Alkohol- und Nikotinkonsum, Geschlecht und der allgemeine Gesundheitszustand (ECOG-Stadium) der Patienten.

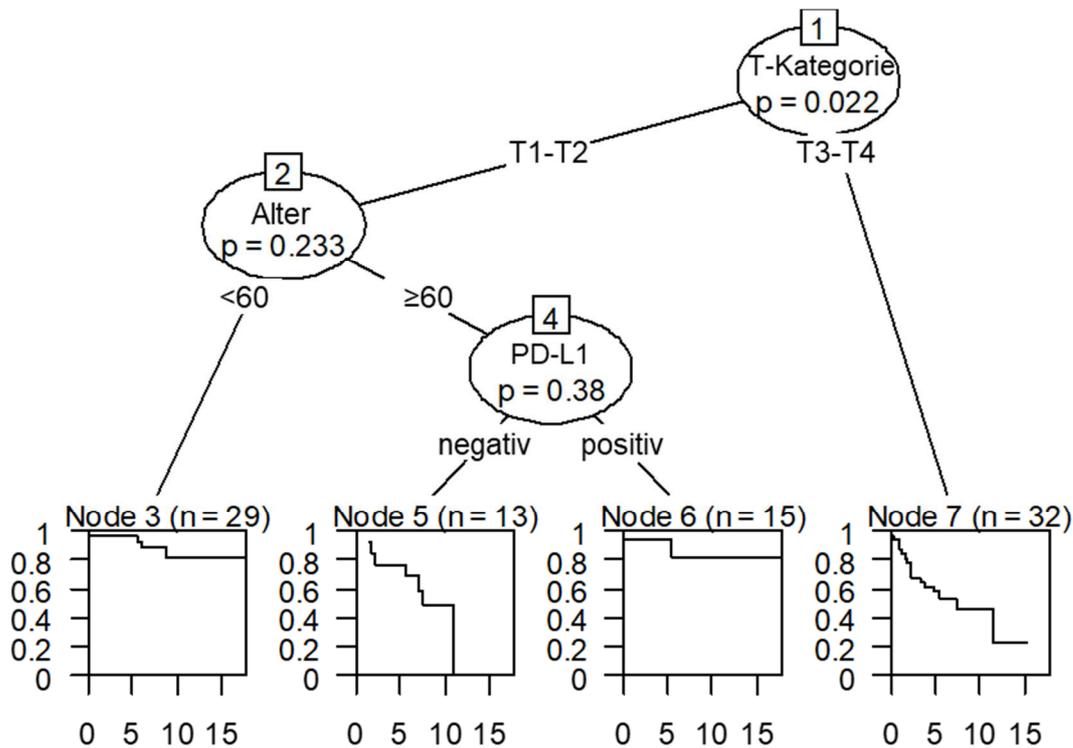


Abbildung 14: Multivariate Modellierung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Überlebenszeit der Patientenstichprobe mit HPV-getriebenen OPSCC mittels rekursiver Partitionierung (RP). Einschlusskriterien: alle Patienten der Stichprobe mit OPSCC im Stadium M0, HPV-getrieben und vollständigen Daten. Verwendete Variablen: PD-L1 Expression, UICC7, TNM-Stadium, Nikotin, Alkohol, Alter, Geschlecht, ECOG-Stadium. Methode: Bonferroni-Korrektur, p-Wert Grenzen (0,5) für Gruppenteilung, Variablen ohne signifikanten Einfluss gehen nicht in die Abbildung ein. Node 1,2,4: Aufspaltung der Gruppen. Node 3,5,6,7: Endpunkte des Modells.

Das Gesamtüberleben der durch die rekursive Partitionierung resultierenden Patientengruppen wird in Abbildung 15A dargestellt. Die Gruppe „Node 3“ unterscheidet sich nicht signifikant von der Gruppe „Node 6“, weshalb diese ebenfalls zu einer Gruppe zusammengefasst wurden und somit drei Risikogruppen gebildet werden konnten (Abbildung 15B). Das 5JÜ der Risikogruppe „niedrig“ unterscheidet sich signifikant von dem der Risikogruppe „hoch“ (55,2% vs. 26,8%). Zwischen der Risikogruppe „mittel“ und der Risikogruppe „niedrig“ lässt sich ein Trend in Bezug auf das Überleben erkennen, nicht jedoch zwischen den Risikogruppen „mittel“ und „hoch“.

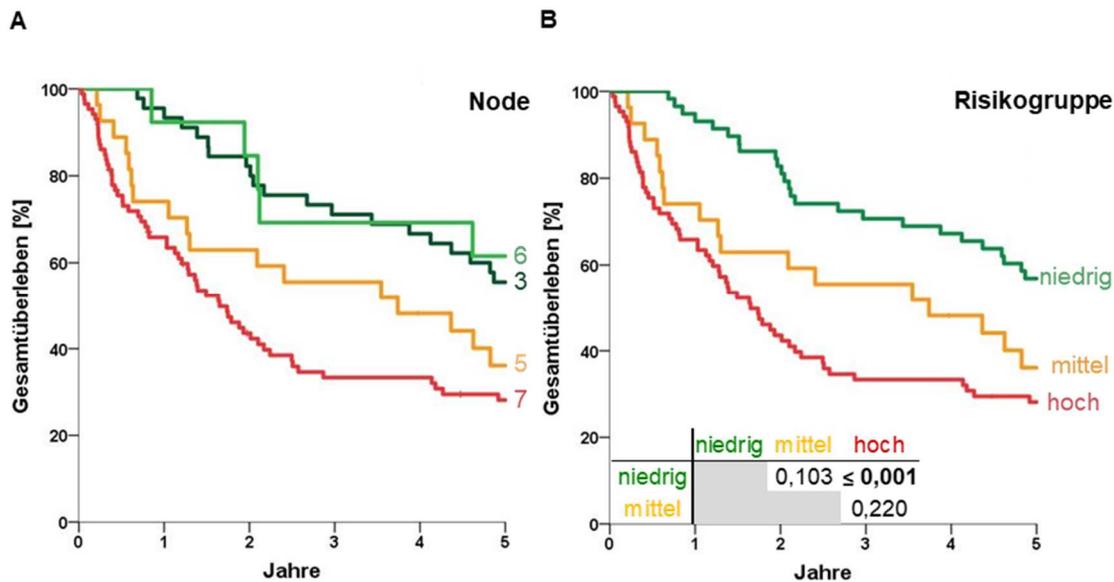


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse aller resultierenden Patientengruppen mit HPV-getriebenem OPSCC nach RP. **A:** Gruppeneinteilung durch entstandene Endpunkte der RP; die Patientengruppen sind wie folgt charakterisiert „Node 3“: T1-2, Alter < 60; „Node 5“: T1-2, Alter ≥ 60, PD-L1 negativ; „Node 6“: T1-2, Alter ≥ 60, PD-L1 positiv; „Node 7“: T 3-4. **B:** Gruppeneinteilung nach Zusammenfassung der nicht signifikant unterschiedlichen Risikogruppen Nodes 3 und 6; „niedrig“: T1-2, Alter < 60 oder T1-2, Alter ≥ 60, PD-L1 positiv; Risikogruppe „mittel“: T1-2, Alter ≥ 60, PD-L1 negativ; Risikogruppe „hoch“: T 3-4. p: log-Rank-Test, signifikante p-Werte (≤ 0,05) fett gedruckt.

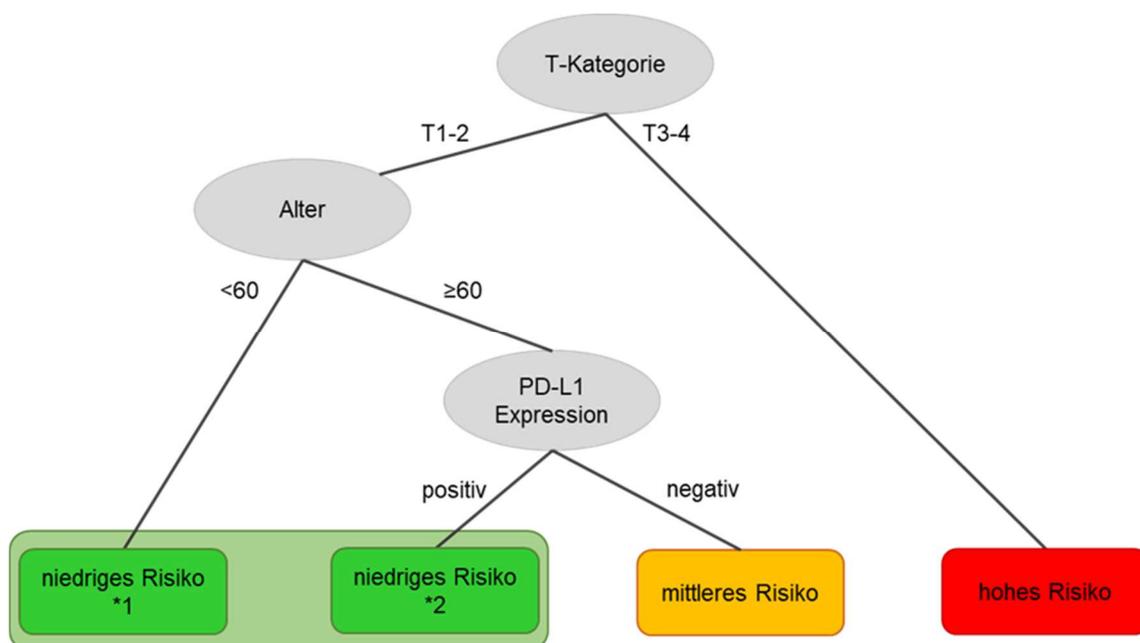


Abbildung 16: Flussdiagramm zur Risikoabschätzung von Patientengruppen mit HPV-getriebenem OPSCC. Die Patientengruppen sind wie folgt charakterisiert „niedriges Risiko *1“: T1-2, Alter < 60; „niedriges Risiko *2“: T1-2, Alter ≥ 60, PD-L1 positiv; „mittleres Risiko“: T1-2, Alter ≥ 60, PD-L1 negativ; „hohes Risiko“: T 3-4.

Die PD-L1 Expression ist für die Einteilung der Patienten mit HPV-getriebenen Tumoren in die Patientengruppen „niedriges Risiko *2“ (T1-2, Alter \geq 60, PD-L1 positiv) oder „mittleres Risiko“ (T1-2, Alter \geq 60, PD-L1 negativ) von Bedeutung (Abbildung 16).

4. Diskussion

Die Therapie von OPSCC befindet sich im Wandel. Molekularbiologisch stellen HPV-getriebene Tumoren eine homogenere Gruppe als die HPV-negativen Tumoren dar, da diese durch „akzidentelle“ Mutations-Ereignisse ausgelöst werden, wie sie z.B. durch Noxen entstehen. In HPV-getriebene Tumoren führen virale Onkoproteine gezielt zu einer Dysregulation von Tumorsuppressoren (p53, Rb-Protein), weshalb es auch ohne Mutation dieser Gene zur Karzinogenese kommen kann. An zielgerichteten Therapien wird intensiv geforscht. Hierfür eignen sich homogene Tumorgruppen besser, da potenzielle Zielstrukturen (*Targets*) gegebenenfalls häufiger auftreten. Ein möglicher Ansatzpunkt einer zielgerichteten Tumorthherapie ist die PD-1/PD-L1-Achse. PD-L1 ist ein transmembran lokalisiertes Protein auf verschiedenen Zellen des Körpers wie z.B. dendritischen Zellen oder Keratinozyten. Daran kann der PD-1-Rezeptor binden, der sich z.B. auf zytotoxischen T-Zellen befindet, wodurch T-Zellen inaktiviert und somit überschießende Autoimmunantworten verhindert werden. Verschiedene Tumoren exprimieren ebenfalls PD-L1 und können durch den beschriebenen Mechanismus dem Immunsystem entfliehen – es kommt zu einem sogenannten „Immun-Escape“.

Checkpoint-Inhibitoren wie z.B. Hemmer der PD-1/PD-L1-Achse können diesen Immun-Escape blockieren. Die eingesetzten Inhibitoren wirken an PD-1, indem sie die Bindungsstelle für PD-L1 blockieren (Lee et al. 2016). Eine Inaktivierung der T-Zellen, die mit ihrem PD-1 Rezeptor an PD-L1 auf Tumorzellen binden, wird somit unterbunden.

Zurzeit werden PD-1-Inhibitoren in klinischen Studien für HNSCC angewandt. Dabei werden sie teilweise ungeachtet der PD-L1 Expression der Tumoren eingesetzt. Allerdings konnte in einigen Studien für andere Tumorentitäten, wie z.B. für das Lungenkarzinom, gezeigt werden, dass Patienten mit PD-L1 Expression des Tumors besser auf diese Therapie ansprechen (Passiglia et al. 2016).

Bei HPV-getriebenen OPSCC liegt eine besondere Immunsituation z.B. durch Verlust von HLA-I (Ashrafi et al. 2006) vor und sie sind häufiger von Immunzellen (z.B. NK-Zellen) infiltriert (Wagner et al. 2016). Die PD-L1 Expression von OPSCC in Hinblick auf den HPV-Status haben jedoch bisher nur wenige Studien untersucht (Kim et al. 2016;

Lyford-Pike et al. 2013). Deshalb war es Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob PD-L1 häufiger in HPV-getriebenen als in HPV-negativen OPSCC exprimiert wird und ob die PD-L1 Expression als potenzieller Immun-Escape-Mechanismus einen Einfluss auf das Überleben der Patienten hat.

4.1. Die Stichprobe

Die Stichprobe (n=278) ist Teil aller Patienten mit OPSCC, die zwischen 2000 und 2017 am Universitätsklinikum Gießen in der Abteilung für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde diagnostiziert und behandelt wurden (n=730). Diese Gesamtkohorte wurde 2019 im Rahmen einer Arbeit über OPSCC in Deutschland und deren Assoziation zu HPV (Prävalenz 27,1%) von unserer Arbeitsgruppe publiziert (Wittekindt et al. 2019). Die untersuchten TMA-Proben sind Teil einer Publikation unserer Arbeitsgruppe über die PD-L1 Expression und das Überleben von Patienten mit OPSCC (Wuerdemann et al. 2020). Der Anteil der HPV-getriebenen Karzinome der in dieser Arbeit untersuchten Stichprobe beträgt 33,9% (Tabelle 6, Abschnitt 3.1.). Castellsagué et al. geben an, dass zwischen 25 und 50% der OPSCC in Nordeuropa HPV-getrieben sind, was sich mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe und dem HPV-getriebenen Anteil in der untersuchten Stichprobe deckt (Castellsagué et al. 2016). Die große Spannweite von 25% in der Angabe von Castellsagué et al. kann durch uneinheitliche Definitionen von OPSCC, intraoperativ uneindeutigem Tumorursprung oder geografische Unterschiede der Inzidenz erklärt werden. Außerdem gibt es verschiedene Testverfahren, um den HPV-Status zu ermitteln. Prigge et al. fanden heraus, dass eine Kombination aus p-16-Immunhistochemie und HPV-DNA-Nachweis mittels PCR die Spezifität signifikant verbessert (Prigge et al. 2017). In dieser Arbeit wurden daher nur solche Karzinome als HPV-getrieben klassifiziert, bei denen sowohl HPV-DNA als auch p16^{INK4a} nachweisbar waren (Abschnitt 2.3.).

Die Stichprobe (n=278 OPSCC) besteht aus 157 Fällen, von denen Proben auf einem TMA verwendet wurden und aus 121 Fällen, von denen Flächenschnitte verwendet wurden. Die Proben auf dem TMA umfassen alle für dieses Verfahren geeigneten OPSCC mit ausreichender Probendicke und Größe der FFPE Gewebeprobe, die zwischen 2000 und 2009 in Gießen diagnostiziert und behandelt wurden (Wuerdemann et al. 2020). Für die Flächenschnitte wurden zum einen alle HPV-getriebenen OPSCC, die nicht für die Erstellung eines TMA geeignet waren bzw. solche die zwischen 2010 und 2017 diagnostiziert und behandelt wurden, verwendet. Zum anderen wurden von (bezüglich TNM-Stadium, Alter und Geschlecht) „passenden“ HPV-negativen OPSCC

Flächenschnitte angefertigt. Es handelt sich daher bei der Stichprobe um keine reine Zufallsstichprobe. Der Ausschluss einer Flächenschnittprobe fällt deshalb nicht ins Gewicht. Zudem wurde kein abgeschlossener Zeitraum betrachtet. Somit ist nicht bei allen Patienten ein „Follow-up“ über 5 Jahre vorhanden und allgemeine Aussagen über Prävalenzen und Inzidenzen sind nicht möglich. Die Auswahl der Stichprobe wurde so getroffen, dass möglichst alle HPV-getriebenen OPSCC aus Gießen betrachtet werden konnten, da das Hauptaugenmerk der Studie die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen HPV und PD-L1 war. Auf die Färbung aller HPV-negativen OPSCC aus Gießen wurde aufgrund der Material- und Personalkosten verzichtet, da entsprechende Ergebnisse bereits vorliegen (Malm et al. 2015).

Für das TMA wurden aus FFPE Gewebeproben 1,2mm große Stenzen entnommen, was eine gewisse Mindestdicke der Tumorprobe voraussetzt und die Nutzung einiger Proben ausschloss. Vorteil dieses Verfahrens ist, dass bei der Färbung weniger Antikörperlösung benötigt wird und mehrere Proben gleichzeitig gefärbt werden können. Somit entfallen Variationen bedingt durch die Handhabung mehrerer Proben, wodurch die Vergleichbarkeit der Färbereaktion zwischen den Proben auf einem TMA wesentlich verbessert wird. Nachteil ist, dass die FFPE Gewebeproben groß und dick genug sein müssen, damit ein oder mehrere Stanzzyylinder entnommen werden können, was zu einer Vorauswahl der Proben führt (operativ behandelte Patienten und größere Tumore). Außerdem können so nur Ausschnitte des Tumors betrachtet werden, was eine Repräsentativität der Stenzen mit dem Gesamtpräparat voraussetzt. Die Positionierung der Stanze kann bei heterogen exprimierten Markern wie PD-L1 (McLaughlin et al. 2016; Nakamura et al. 2017) auch das Ergebnis beeinflussen. Dagegen wurde bei den Flächenschnitten jeweils ein Schnitt der vollständigen FFPE Probe angefertigt. Vorteil eines Flächenschnitts ist, dass eine komplette Betrachtung des Tumors in dieser Schnittebene möglich ist und so auch heterogene Tumoren beurteilbar sind. Nachteil ist, dass mehr Antikörper und andere Verbrauchsmaterialien benötigt werden und besonders bei manueller Färbung der Aufwand mit der Anzahl der Präparate ansteigt.

Die Vergleichbarkeit von TMA und Flächenschnitten wurde in verschiedenen Studien betrachtet. Dabei zeigte sich eine hohe Konkordanz zwischen Flächenschnitten und TMA (Jawhar 2009). Allerdings muss angemerkt werden, dass es keine spezifischen Studien zu OPSCC und insbesondere einen Vergleich zu PD-L1 Färberegebnissen auf TMA und Flächenschnitten gibt. Munari et al. haben in ihrer Studie die PD-L1 Expression auf Flächenschnitten und TMA in NSCLC verglichen (Munari et al. 2018). Hierbei zeigte sich eine Übereinstimmung von 93%, obwohl die PD-L1 Expression in diesen Tumoren heterogen ist. Betrachtet man dieses Ergebnis, so erscheint eine gemeinsame

Auswertung von Flächenschnitten und TMA möglich, da eine relativ große Übereinstimmung herrscht. Dennoch besteht die Möglichkeit einen Tumor falsch zu bewerten, wenn nur ein Ausschnitt betrachtet wird. Daher sollte dies in Überlegungen bezüglich der Expression von PD-L1 mit einbezogen werden.

4.2. Klinische Datenerhebung und experimentelle Vorgehensweise

Für die Erhebung der klinischen Daten und Risikofaktoren der Patienten wurden die dokumentierten Befunde und Anamnesegespräche ausgewertet. Daten wie Alter, Geschlecht und Zeitpunkt der Diagnose sind wenig fehleranfällig. Das TNM-Stadium kann sich jedoch klinisch und pathologisch unterscheiden, wodurch hier Fehler in der Datenerhebung auftreten könnten. Für unsere statistische Auswertung wurde falls möglich das pathologische TNM-Stadium verwendet. Bei Patienten, die nicht operiert wurden und bei denen somit kein pathologisches TNM-Stadium vorliegt, wurde das klinische TNM-Stadium verwendet. Hierdurch könnten Unsicherheiten der Daten erzeugt werden, wenn beispielsweise systematisch ein höheres (oder niedrigeres) TNM-Stadium in der klinischen im Vergleich zur pathologischen Beurteilung vergeben würde. Bei Angaben bezüglich Rauchen und Alkoholkonsum ist man auf die Aussagen des Patienten angewiesen. Auf Grund von Scham- oder Schuldgefühlen können Alkohol- und Nikotinabusus verheimlicht bzw. eine reduzierte Menge angegeben werden oder ein relevanter Konsum, der zeitlich zurückliegt, bleibt unberücksichtigt. Zum Teil wurden Alkohol- und Rauchverhalten in der Anamneseerhebung nicht eindeutig bzw. wenig umfangreich dokumentiert, sodass in einigen Fällen keine oder nur stark vereinfachte Angaben vorhanden sind. Für die Betrachtung des Gesamtüberlebens ist es wichtig ein „Follow-up“ der Patienten zu haben. Einige Patienten erschienen jedoch nach einer gewissen Zeit aus ungeklärten Gründen nicht mehr zu den geplanten Kontrollterminen, weshalb diese Fälle in der Überlebensanalyse zensiert werden mussten.

Alle Proben der Stichprobe wurden im gleichen Färbeautomaten und nach dem gleichen, für den Antikörper validierten Färbeprotokoll (Abschnitt 2.5.) gefärbt. Dies reduziert Variationen, die z.B. durch händisches Färben oder durch unterschiedliche Inkubationszeiten entstehen können. Dabei wurde der Antikörper „PD-L1 IHC 28-8 pharmDx“ (Dako) verwendet. Dieser wird auch bei der Testung von PD-L1 Expression in klinischen Studien zur Anwendung von „Nivolumab“ eingesetzt (Wolchok et al. 2013) und ist ein durch die FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) validierter Antikörper. Da in vielen älteren Studien unterschiedliche und auch nicht validierte Antikörper verwendet

wurden, ist die Vergleichbarkeit dieser Studien untereinander und mit unseren Ergebnissen problematisch.

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte erfolgte lichtmikroskopisch. Da bei einer solchen Auswertung ein einzelner Untersucher subjektiv entscheiden kann, wurden die Proben von zwei Untersuchern (darunter eine erfahrene Pathologin) verblindet ausgewertet und ihre Ergebnisse gemeinsam verglichen. Transmembrane Moleküle wie PD-L1 werden als randständige Färbung von Zellen sichtbar, die vergleichsweise einfach beurteilbar ist. Bei der Auswertung unserer Stichprobe wurden nur Zellen berücksichtigt, die eine vollständig die Zelle umgebende randständige Färbung zeigten (Abbildung 3, Abschnitt 3.2.). Zur weiteren Objektivierbarkeit wurden die OPSCC anhand eines prozentualen Scores in verschiedene Expressionsklassen (0%, $\geq 1\%$, $\geq 5\%$, $\geq 10\%$, $\geq 25\%$, $\geq 50\%$, Abbildung 4, Abschnitt 3.2.) eingeteilt. Als positive PD-L1 Expression wurde für die dichotomisierte Auswertung eine Färbung von $\geq 1\%$ der Tumorzellen gewertet. Ein Cutoff von 1% wurde auch in anderen Studien verwendet (Passiglia et al. 2016; Kintsler et al. 2019). Auch ein relativ geringer Anteil von 1% kann biologisch relevant sein: Durch den PD-L1 Immun-Escape könnte nach behandlungsinduzierter Immunreaktion ein geringer Teil resistenter Tumorzellen übrigbleiben, die zu einem Rezidiv führen könnten. Jedoch wird die Grenze der PD-L1 Expression nicht einheitlich angewendet (Udall et al. 2018). Rimm et al. untersuchten an NSCLC die Sensitivität und Spezifität verschiedener Grenzen, ab der eine Probe als „positiv“ bezeichnet wird. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Spezifität bei einem Cutoff von 1% bei 70-80% liegt und bei einem Cutoff von 5% auf 90% ansteigt (Rimm et al. 2017). Prinzipiell gilt je höher man den Cutoff wählt, desto weniger falsch negative Ergebnisse erhält man. Allerdings zeigen einige Tumoren ein heterogenes Expressionsmuster (Abbildung 17, Abschnitt 10.). Würde für die Testung ein Teil des Tumors mit wenig PD-L1 Expression verwendet werden, könnten bei einem hohen Cutoff solche Tumoren als negativ bewertet werden. Dadurch würde womöglich bei Patienten mit heterogenen Tumoren eine geeignete Behandlung nicht durchgeführt werden. Wählt man einen niedrigen Cutoff, so werden alle Patienten eingeschlossen, die möglicherweise von einer Behandlung profitieren (Hutarew 2016). Jedoch werden somit auch vermehrt falsch-positive Patienten behandelt, die dann unter den potenziell auftretenden Nebenwirkungen leiden könnten.

4.3. PD-L1 Expression bei OPSCC

In unserer Stichprobe (n=278) zeigten 106 Proben (38,1%) eine deutliche, membranständige PD-L1 Expression (Tabelle 7, Abschnitt 3.2.). Ein ähnlicher Anteil PD-L1 positiver OPSCC konnte in anderen Studien zu HNSCC bisher nicht gezeigt werden (Müller et al. 2017; Feldman et al. 2016; Ferris et al. 2016). In diesen Studien wurden deutlich niedrigere (Feldman et al. 16%) oder deutlich höhere Anteile (Müller et al. 85-95%; Ferris et al. 57,3%) positiver Fälle gefunden. Dies könnte an den verschiedenen Antikörpern („ERP1161“ von Abcam; SP142 von Roche; 28-8 pharmDx von Dako) liegen. Des Weiteren sind die Kriterien von „positiv“ für PD-L1 nicht standardisiert und es wurden unterschiedliche Cutoffs (Abstufung „negativ“, „low“ und „high“; $\geq 5\%$; $\geq 1\%$) verwendet. Außerdem unterscheiden sich die untersuchten Stichproben in der Zusammensetzung bezüglich der Tumorlokalisation. Häufig wurden HNSCC allgemein untersucht ohne Sublokalisationen zu berücksichtigen. HPV spielt hauptsächlich in der Karzinogenese von OPSCC eine Rolle, weshalb die Prävalenz HPV-getriebener Tumoren niedriger ist, wenn man HNSCC allgemein betrachtet. Zudem muss angemerkt werden, dass unsere Stichprobe in Bezug zum HPV-Status keine Zufallsstichprobe ist, da alle zur Verfügung stehenden HPV-positiven Präparate untersucht werden sollten. Am ehesten lassen sich unsere Ergebnisse mit denen von Ferris et al. vergleichen. Sie konnten zeigen, dass unter Verwendung des gleichen Cutoffs und Antikörpers 57,3% der getesteten HNSCC PD-L1 auf der Oberfläche exprimierten. Es ist denkbar, dass die Abweichung zu unseren Ergebnissen durch die individuelle Zusammensetzung der Kohorten oder einen anderen Anteil an OPSCC erklärt werden kann. Zu letzterem fehlen jedoch genaue Angaben in der publizierten Arbeit (Ferris et al. 2016).

4.4. PD-L1 Expression bei HPV-negativen und HPV-getriebenen OPSCC

Bei HPV-getriebenen OPSCC konnten wir signifikant häufiger eine PD-L1 Expression als bei HPV-negativen feststellen (51,1% vs. 31,7%, Tabelle 7, Abschnitt 3.2.). In anderen Studien wurde bei HPV-getriebenen Karzinomen ebenfalls eine häufigere PD-L1 Expression (Lyford-Pike et al.: 70%) oder kein Zusammenhang (Kim et al. 2016) gezeigt. Allerdings wurde in beiden Studien ein anderer PD-L1 Antikörper (mAb 5H1) verwendet und erst eine Expression von $\geq 5\%$ (Lyford-Pike et al. 2013) bzw. $\geq 20\%$ (Kim et al. 2016) wurde als „positiv“ gewertet. Daher sind diese Ergebnisse mit den unsrigen nur bedingt vergleichbar. Betrachtet man Cervixkarzinome, die fast ausschließlich HPV-getrieben sind, konnte in verschiedenen Studien eine PD-L1 Expression zwischen 32%

und 70% gefunden werden (Meng et al. 2018; Grochot et al. 2019; Reddy et al. 2017), was unserer Expressionsrate ähnelt.

Für einen Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und der PD-L1 Expression sprechen mehrere Argumente. Durch HPV liegt bei einigen OPSCC eine besondere Immunsituation vor. Ashrafi et al. konnten zeigen, dass HPV-Onkoproteine die Expression von HLA-I Molekülen auf der Oberfläche von infizierten Zellen verhindern (Ashrafi et al. 2006). Dadurch werden keine Virusantigene auf der Zelloberfläche präsentiert, was einen Immun-Escape Effekt bedingen könnte. In unserer Arbeitsgruppe wurde herausgefunden, dass in HPV-getriebenen OPSCC mehr NK-Zellen vorhanden sind als in HPV-negativen OPSCC (Wagner et al. 2016). Diese werden vermutlich durch den Verlust von HLA-I auf der Zelloberfläche angezogen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es bei einer Herunterregulierung von HLA-I zu einer Hochregulierung von PD-L1 kommt (Sottile et al. 2016). Da HPV die HLA-I Expression verhindert, könnte HPV somit indirekt eine PD-L1 Expression bedingen. Dies spielt im natürlichen Reproduktionszyklus von HPV vermutlich kaum eine Rolle. Denn die wichtigsten Zellen des PD-L1 Immun-Escapes, die T-Zellen, sind selten oberhalb der Basalmembran zu finden. Durchbrechen jedoch infizierte Tumorzellen die Basalmembran könnte eine HPV-bedingte PD-L1 Expression einen Selektionsvorteil für diese Tumorzellen darstellen und eine mögliche Erklärung für die höhere Rate PD-L1 positiver Proben bei HPV-getriebenen OPSCC sein. Zudem vermutet man bei HPV-getriebenen OPSCC einen besonderen Stoffwechsel. Der so genannte „Warburg-Effekt“ bewirkt in vielen Tumorentitäten, dass zur Energiegewinnung hauptsächlich die Glykolyse dient. Dadurch kann schnell und unabhängig von Sauerstoff Energie bereitgestellt werden. Dieser Effekt tritt bei den meisten Tumoren erst auf, wenn sie auf Grund ihres Größenwachstums hypoxisch werden. Unter diesen Bedingungen wird der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 α (HIF-1 α) nicht abgebaut bzw. durch Aktivierung eines spezifischen Genexpressionsmusters induziert und der Warburg-Effekt unterstützt. Es wurde herausgefunden, dass HPV-Onkoproteine HIF-1 α stabilisieren (Nakamura et al. 2009). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass HPV-getriebene HNSCC-Zelllinien auch unter Normoxie erhöhte HIF-1 α Level zeigen (Knuth et al. 2017). HPV nutzt dabei vermutlich den HIF-1 α induzierten Signalweg zur Baustoffsynthese statt zur Energieerzeugung (Noch und Khalili 2012). Da bei der Glykolyse in großen Mengen Acetyl-CoA entsteht, kann dieses Intermediat in anabolen Prozessen zur Virusreplikation verwendet werden (Martínez-Ramírez et al. 2018). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α wiederum durch Bindung an den Enhancer des PD-L1 Gens die Expression von PD-L1 heraufreguliert (Noman et al. 2014; Zhao et al. 2019). Auch dies lässt

vermuten, dass der positive HPV-Status mit der erhöhten PD-L1 Expression zusammenhängen könnte.

In unserer Stichprobe tritt eine PD-L1 Expression signifikant öfter bei Nichtrauchern (61,1% vs. 33,3%) und Nichttrinkern (50,0% vs. 29,9%) auf (Tabelle 7, Abschnitt 3.2.). Für die OPSCC Subentität der Tonsillenkarzinomen wurde eine PD-L1 Expression ebenfalls häufiger bei Nichtrauchern bzw. Nichttrinkern nachgewiesen (Hong et al. 2016). Bei OPSCC konnte jedoch bisher kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Rauchen und der PD-L1 Expression gefunden werden (Ukpo et al. 2013). In einer Studie zu NSCLC dagegen zeigte sich, dass PD-L1 signifikant häufiger bei Rauchern als bei Nichtrauchern exprimiert wird (Boothman et al. 2019). Um unsere Ergebnisse mit diesen zu vergleichen, haben wir zur näheren Betrachtung des Faktors Rauchen nur die HPV-negativen OPSCC untersucht, da diese ebenso wie NSCLC vermehrt durch Noxen entstehen. In unserer Stichprobe exprimieren HPV-negative OPSCC von Rauchern signifikant seltener PD-L1 ($p=0,015$; Abbildung 5A, Abschnitt 3.2.) was ein gegenteiliges Ergebnis zu NSCLC darstellt. Hierbei muss jedoch zum einen auf die methodischen Unterschiede hingewiesen werden. In der Arbeit von Boothman et al. wurde der Antikörper SP263 von Roche und ein Cutoff von 25% verwendet. Zum anderen sind OPSCC und NSCLC unterschiedliche Entitäten. NSCLC fassen eine Gruppe von Lungenkarzinomen zusammen, zu denen Plattenepithel-, Adeno- und großzellige Karzinome gehören, wohingegen OPSCC ausschließlich Plattenepithelkarzinome sind. Zudem handelt es sich bei OPSCC um stark mit Immunzellen infiltrierte Tumore, die umgeben von dem lymphatisch aktiven Waldeyer-Rachen-Ring entstehen. Man könnte annehmen, dass solche Tumoren auf Grund der Expression von PD-L1 in dieser Umgebung häufiger entstehen können. Dies könnten die Unterschiede der Expression von Immun-Checkpoint Molekülen in den verschiedenen Tumorentitäten erklären. Weiterhin stellt sich die Frage, ob bei OPSCC die Risikofaktoren Rauchen und Alkoholkonsum mit einer erhöhten PD-L1 Expression indirekt zusammenhängen, da diese auch signifikant mit dem HPV-Status der OPSCC korrelieren (Wittekindt et al. 2018). Ein direkter Zusammenhang könnte gegebenenfalls durch die allgemein bekannten immunmodulatorischen Effekte von Alkohol und Rauchen erklärt werden. Geht man davon aus, dass bei intaktem Immunsystem ein Tumorwachstum durch die Expression von PD-L1 und den entsprechenden Immun-Escape ermöglicht wird, würde dies einen möglichen Grund für die häufigere PD-L1 Expression bei Nichtrauchern und Nichttrinkern darstellen. Im Umkehrschluss könnte man vermuten, dass Tumoren von Rauchern und Patienten mit hohem Alkoholkonsum durch die Veränderung

(Suppression) des Immunsystems seltener PD-L1 exprimieren „müssen“, da der Druck des Immunsystems auf das Tumorwachstum per se geringer ist.

Bei älteren Patienten (>60 Jahre) konnten wir eine signifikant höhere PD-L1 Expression (43,5% vs. 32,1%) feststellen als bei Jüngeren (Tabelle 7, Abschnitt 3.2.). Kürzlich konnte eine Hochregulierung von PD-L1 bei Patienten mit HNSCC im Alter gezeigt werden (Wu et al. 2019), was unsere Ergebnisse in dieser Hinsicht bestätigt. Es ist bekannt, dass sich das Immunsystem im Alter verändert. Beispielsweise kommt es zu Defekten der T-Zellfunktionen (Weiskopf et al. 2009). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass es im Alter zu einer Heraufregulation von PD-1 auf T-Zellen kommt (Shimada et al. 2009). Die von Wu et al. und uns beobachtete Zunahme der PD-L1 Expression bei Tumoren älterer Patienten könnte somit eine Kompensationsreaktion der Tumorzellen sein, um T-Zellen mit verstärkter PD-1-Rezeptor Expression weiterhin zu inaktivieren. Demnach bietet die Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen bei älteren Patienten einen Vorteil für das Voranschreiten des Tumorwachstums.

In Bezug auf die Faktoren UICC-Stadium, TNM-Stadium und Geschlecht konnten wir keine Unterschiede in der PD-L1 Expression nachweisen (Tabelle 7, Abschnitt 3.2.), was durch bereits publizierte Daten bestätigt wird (Kim et al. 2016),

4.5. Univariate Analyse von Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben

In unserer Stichprobe zeigt sich, dass Patienten mit HPV-getriebenen im Vergleich zu HPV-negativen OPSCC ein signifikant höheres Gesamtüberleben haben (5JÜ: 77,5% vs. 38,5%, $p \leq 0,001$, Tabelle 8, Abschnitt 3.3.). Betrachtet man das 3JÜ (82,6% vs. 49,6%) kann dies durch sehr ähnliche publizierte Daten (82,4% vs. 57,1%) bestätigt werden (Ang et al. 2010). Daher kann man vermuten, dass unsere Daten dennoch repräsentativ sind, obwohl es sich bedingt durch das Studiendesign nicht um eine zufällige Stichprobe handelt. In der univariaten Analyse des Gesamtüberlebens unserer Stichprobe stellte der HPV-Status den positiven Einflussfaktor dar, der das Risiko (HR=0,31), an einem OPSCC zu versterben, am stärksten reduziert (Tabelle 8, Abschnitt 3.3.). Ein sehr ähnliches Ergebnis (HR=0,35) konnte für eine Kohorte von Patienten mit HNSCC gezeigt werden, obwohl diese mit 64% OPSCC nicht homogen zusammengesetzt ist (Fakhry et al. 2008). Wie hinreichend bekannt ist, zeigten zudem die Risikofaktoren: ECOG-Stadium, UICC, T-Kategorie, Nikotin- und Alkoholkonsum und Alter in unserer Stichprobe einen signifikanten Einfluss auf das OS (Tabelle 8, Abschnitt 3.3.), was mit Ergebnissen von Fakhry et al. und Ang et al. vergleichbar ist.

Auch die PD-L1 Expression hat in unserer Stichprobe einen positiven Einfluss auf das OS (5JÜ: 62,2% vs. 44,9%) und reduziert das Risiko zu versterben auf 66% (HR=0,66; $p=0,015$; Tabelle 8, Abschnitt 3.3.). Da es durch PD-L1 zu einem Immun-Escape kommt, würde man allerdings einen negativen Effekt auf das Überleben erwarten, weil „Tumor-hemmende“ Zellen (Immunzellen) inaktiviert werden. Eine mögliche Erklärung für das von dieser Erwartung abweichende Ergebnis könnte sein: Die PD-L1 Expression wurde vor der Therapie bestimmt, also unter Bedingungen, die durch Tumorwachstum gekennzeichnet sind. Die Tumorzellen müssen PD-L1 möglicherweise nur bei einer individuell erhöhten Anwesenheit von Immunzellen exprimieren, also bei OPSCC mit einer grundsätzlich erhöhten Infiltration durch Immunzellen. Unter Therapie verändert sich unter Umständen die Suppression der Immunzellen. Diese könnten dadurch aktiviert werden und verbliebene Tumorzellen bekämpfen, was zu einem besseren OS führen könnte. Sind jedoch vor der Therapie keine Immunzellen in der Nähe des Tumors vorhanden, müssten die Tumorzellen kein PD-L1 exprimieren. Somit würden Therapiebedingt auch keine bzw. wenige Immunzellen aktiviert werden, da per se weniger vorhanden sind. Es verblieben somit häufiger unbekämpfte Tumorzellen zurück, was zu einem schlechteren OS führen könnte.

Zu HNSCC wurden in verschiedenen Studien unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses von PD-L1 auf das OS gefunden. Es konnten positive (Jia et al. 2019; Hong et al. 2016), keine (Kim et al. 2016; Li et al. 2017) oder negative (Müller et al. 2017) Einflüsse festgestellt werden. Unsere Ergebnisse lassen sich am ehesten mit denen von Hong et al. vergleichen. Sie konnten zeigen, dass bei Tonsillenkarzinomen die PD-L1 Expression einen signifikanten positiven Einfluss (HR=0,46; $p=0,019$) auf das OS hat (Hong et al. 2016). Für verschiedene andere Tumorentitäten (Plattenepithelkarzinome des Ösophagus, Kolonkarzinome, frühe Plattenepithelkarzinome und EBV-assoziierte lymphoepithelioma-ähnliche Karzinome der Lunge) konnte PD-L1 ebenfalls als positiver Faktor für das Überleben der Patienten bestätigt werden (Jiang et al. 2017; Drosier et al. 2013; Schmidt et al. 2015; Jiang et al. 2015). Obwohl sich diese Studien auf unterschiedliche Tumorentitäten und damit auch verschiedene Gewebe beziehen, zählen alle diese Gewebe zu den Schleimhäuten und werden von lymphatischem Gewebe infiltriert (MALT=*mucosa associated lymphoid tissue*). Man könnte daher auf einen Zusammenhang zwischen dem positiven Einfluss von PD-L1 auf das Überleben und der Immunzellinfiltration schließen. Zur Diskrepanz der verschiedenen Ergebnisse lässt sich anmerken, dass es keine Standards für die Detektion der PD-L1 Expression gibt (siehe oben). Zudem ist anzumerken, dass die PD-L1 Expression in den genannten Studien an prätherapeutischen Proben untersucht wurde. Die Patienten erhielten die für

den jeweiligen Tumor vorgesehene Standardtherapie, welche für jede Entität unterschiedlich ist. Es könnte sein, dass durch die verschiedenen Therapien bei PD-L1 positiven Tumoren zusätzliche oder andere Effekte ausgelöst werden, die die Unterschiede im OS erklären.

4.6. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens mittels Cox Regression

In die multivariaten Analysen wurden alle „inhaltlich“ voneinander unabhängigen Variablen einbezogen. In der ersten multivariaten Analyse (Tabelle 9, Abschnitt 3.4.) stellte sich der Nikotinkonsum im Gegensatz zur univariaten Analyse nicht mehr als signifikanter Einflussfaktor dar. Wie bereits gezeigt werden konnte, ist Rauchen mit negativem HPV-Status von OPSCC assoziiert (Gillison et al. 2008), wodurch es vermutlich keinen unabhängigen Faktor darstellt und daher in der multivariaten Analyse keinen signifikanten Einfluss zeigt. Nach Ausschluss der Variablen Rauchen, Geschlecht und N-Kategorie entstand ein stabiles Modell (Tabelle 10, Abschnitt 3.4.), da sich die Werte (HR, oberes und unteres 95% Konfidenzintervall, p-Wert) der verbliebenen Variablen kaum vom vorherigen Modell unterscheiden. Der HPV-Status stellt sich in diesem Modell weiterhin als wichtigster und unabhängiger Einflussfaktor für das Gesamtüberleben dar (HR=0,329; $p \leq 0,001$). Auch Fakhry et al. konnten in ihrer Studie HPV als unabhängigen Faktor mit einer ähnlichen HR (HR=0,36; $p=0,02$) herausarbeiten. Dabei gingen in ihre Analyse ähnliche Variablen ein (Alter, ECOG-Stadium, Tumorstadium, HPV-Status), die jedoch zum Teil anders als in unserer Untersuchung dichotomisiert wurden (ECOG 0 vs. 1-2, AJCC Stadium I-III vs. IV) (Fakhry et al. 2008). Nichtsdestotrotz stellten sich wie in dieser Studie (Fakhry et al. 2008) die Variablen T-Kategorie, Alkoholkonsum, Alter und Gesundheitszustand als weitere unabhängige Variablen in der multivariaten Analyse dar (Tabelle 10, Abschnitte 3.4.).

Wie auch in der univariaten Analyse zeigte sich PD-L1 als signifikante Einflussgröße auf das OS (HR=0,617; $p=0,014$, Tabelle 10, Abschnitte 3.4.). Da sich p-Wert und Hazard Ratio nach Ausschluss der Variablen Rauchen, Geschlecht und die N-Kategorie nur geringfügig ändern, kann PD-L1 in Bezug auf die gesamte Stichprobe als unabhängiger Einflussfaktor betrachtet werden. Multivariate Analysen, die PD-L1 bei OPSCC als unabhängigen positiven prognostischen Marker zeigen, sind in der Literatur aktuell nicht zu finden. Für andere Tumorentitäten ließ sich PD-L1 nicht als unabhängige Variable (Hong et al. 2016; Jiang et al. 2017) oder nur mit einem Trend (Jiang et al. 2015 $p=0,08$) als unabhängige Variable feststellen. Da in die Analysen jedoch andere Variablen

eingeschlossen wurden und es sich zudem um verschiedene Tumorentitäten handelt, ist es schwierig, diese Modelle mit unserer Analyse zu vergleichen.

4.6.1. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens mittels Cox Regression in Subkohorten stratifiziert nach dem HPV-Status

Da der HPV-Status ein wichtiger Faktor für das Überleben ist und sich die Patienten auch hinsichtlich ihrer Risikofaktoren signifikant unterscheiden, wurden die HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC getrennt voneinander betrachtet. Die Anzahl der Variablen bei derartigen Modellen sollte an die Anzahl der Ereignisse angepasst sein. Für ein valides Modell sollten etwa 10 Ereignisse pro betrachtete Variable vorhanden sein (Peduzzi et al. 1995). Daher muss das Ergebnis der HPV-getriebenen OPSCC besonders kritisch betrachtet werden. Um die Modelle jedoch miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils dieselben Variablen einbezogen, die sich in der multivariaten Analyse der gesamten Stichprobe als unabhängig herausgestellt hatten.

Bei den Patienten mit HPV-negativem OPSCC war der Einfluss von PD-L1 im Modell weiterhin signifikant und die Hazard Ratio änderte sich kaum ($HR=0,645$; $p=0,045$). Daraus lässt sich schließen, dass PD-L1 in der Gruppe der HPV-negativen OPSCC ein unabhängiger Einflussfaktor für das Überleben ist (Tabelle 11, Abschnitt 3.4.1.). Ein signifikanter Einfluss von PD-L1 lässt sich ebenfalls in der univariaten Analyse der HPV-negativen OPSCC erkennen (Abbildung 7C, Abschnitt 3.3.). Die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier zeigen, dass Patienten mit einem HPV-negativen OPSCC ein signifikant schlechteres Überleben haben, wenn die Tumoren ebenfalls als PD-L1 negativ gewertet wurden ($p=0,043$). In der multivariaten Analyse zeigten sich außerdem die T-Kategorie und das ECOG-Stadium als unabhängige Faktoren für Patienten mit HPV-negativen OPSCC (Tabelle 11, Abschnitt 3.4.1.).

Bei den Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC zeigt sich lediglich das Alter in diesem Modell als unabhängige Variable ($p=0,032$). Dies lässt vermuten, dass (wie im Vorfeld schon angenommen) eine Assoziation von PD-L1 Expression und positivem HPV-Status vorliegt und sich dadurch in der multivariaten Analyse kein unabhängiger Einfluss des Faktors darstellt. Wenn man in der univariaten Analyse nur die HPV-getriebenen OPSCC betrachtet, zeigt die PD-L1 Expression keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben (Abbildung 7D, Abschnitt 3.3.), was diese Annahme ebenfalls unterstützt. Im Beobachtungszeitraum kam es lediglich zu 20 Ereignissen (Tod des Patienten). Jedoch wurden zur Vergleichbarkeit mit den HPV-negativen Fällen ebenfalls 5 Variablen in das

Modell mit einbezogen (Tabelle 12, Abschnitt 3.4.2.), so dass diese Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren sind.

4.7. Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens mittels rekursiver Partitionierung

Die rekursive Partitionierung (RP) ist eine andere Form der multivariaten Analyse. Dabei errechnet das Modell mithilfe einer vorher gewählten „p-Wert Grenze“, welche Variablen in Bezug auf das Gesamtüberleben zu einer signifikanten Aufspaltung der Stichprobe führen. Die Aufspaltungs- und Endpunkte der RP werden in der Ausgabe des Modells als „Node“ bezeichnet und das entstandene Modell zeigt eine hierarchische Struktur. Der hierarchisch erste Aufspaltungspunkt des Modells (Node 1) zeigt die Variable an, die den größten Einfluss auf das Überleben der Patienten der Stichprobe hat. Wir haben die so entstehende Gruppeneinteilung genutzt, um Risikogruppen zu definieren. Für die einzelnen Gruppen wurde das Gesamtüberleben berechnet und die resultierenden Gruppen, die sich nicht signifikant unterschieden, wurden anschließend zusammengefasst (Abschnitt 3.5.). Vorteil dieses Modells ist es, dass alle Variablen zusammen betrachtet werden und nicht wie bei der Cox Regression jede Variable einzeln. Strobel et al. beschreiben die Vor- und Nachteile dieser Art der multivariaten Analyse (Strobl et al. 2009). So können auch komplexe Modelle mit vielen Interaktionen berechnet werden. Jedoch ist die Interpretation des resultierenden Modells nicht immer einfach. Zum Beispiel werden Fälle mit fehlenden Daten per Zufall zugeteilt, so dass die Datenqualität von besonderer Wichtigkeit für den Vorhersagewert des Modells ist. Auch die exakte Auswahl der Variablen, die zur Aufteilung der betrachteten Fälle führt, ist von den gesamten Daten abhängig. Dadurch kann bei mehrfacher Berechnung das Modell unterschiedliche Ergebnisse liefern und diese sind nicht ausnahmslos allgemeingültig. Es kann zu einem sogenannten „*Overfitting*“ kommen, was bedeutet, dass es durch Einbeziehung unwichtiger Variablen und deren zufälliger Streubreite dazu kommen kann, dass diese als signifikant erachtet werden bzw. eigentlich signifikante Variablen nicht mehr signifikant erscheinen (Strobl et al. 2009).

Für die gesamte Stichprobe zeigte sich bei dieser Art der Modellierung wiederum der HPV-Status als wichtigster Einflussfaktor für das Überleben, da er zur ersten Aufspaltung im Modell führte (Abbildung 8, Abschnitt 3.5.). Dies passt zu den Ergebnissen der univariaten und multivariaten Analyse mittels Cox Regression. Dem HPV-Status untergeordnet waren Gesundheitszustand (ECOG-Stadium) und T-Kategorie als weitere wichtige Einflussfaktoren, die in der uni- und multivariaten Analyse mittels Cox

Regression mit ähnlichen Ergebnissen ebenfalls vertreten sind. Unter der verwendeten p-Wert Grenze von 0,05 zeigte PD-L1 keinen Einfluss auf das Modell. Die erstellten Risikogruppen („niedrig“: HPV-getrieben, T 1-2; „mittel“: HPV-negativ, ECOG 0-1 oder HPV-getrieben, T 3-4; „hoch“: HPV-negativ, ECOG 2-4) fassen diese Ergebnisse zusammen (Abbildung 9, Abschnitt 3.5.). Mit dem hieraus abgeleiteten Flussdiagramm (Abbildung 10, Abschnitt 3.5.) kann schnell und einfach das individuelle Risiko des Patienten abgeschätzt werden was im Einklang mit der allgemein anerkannten Bedeutung der Risikofaktoren ist.

Wie auch in der multivariaten Analyse mittels Cox Regression wurde die RP für die Gruppe der HPV-getriebenen und HPV-negativen OPCSS getrennt betrachtet. Dabei wurden die p-Wert Grenzen herabgesetzt, um zu schauen, ab wann sich ein Einfluss von PD-L1 im Modell aufzeigt.

In der Gruppe der HPV-negativen OPCSS zeigte sich bei einer p-Wert Grenze von 0,5 der Gesundheitszustand (ECOG-Stadium) als größter Einflussfaktor (Abbildung 11, Abschnitt 3.5.1.). Dies hatte auch die multivariate Analyse mittels Cox Regression gezeigt. Die darauffolgenden Faktoren waren Alter der Patienten, T-Kategorie und Alkoholkonsum (Abbildung 11, Abschnitt 3.5.1.). In der multivariaten Analyse mittels Cox Regression hatte sich nur die T-Kategorie als unabhängige Variable dargestellt. Das abweichende Ergebnis der RP kann mit der für diese Analyse sehr hoch gewählten p-Wert Grenze zusammenhängen. Bei p-Werten $\leq 0,5$ wurde in diesem Modell eine Aufspaltung in lediglich zwei Gruppen (anhand des Gesundheitszustands) vorgenommen. Trotz dieser hohen p-Wert Grenze konnten wir in diesem Modell keinen Einfluss von PD-L1 feststellen, was im Gegensatz zu unserer multivariaten Analyse mittels Cox Regression steht.

In der Gruppe der HPV-getriebenen OPSCC konnte bei einer p-Wert Grenze von 0,5 ein Einfluss von PD-L1 auf das Überleben gezeigt werden (Abbildung 14, Abschnitt 3.5.2.). T-Kategorie und Alter des Patienten waren jedoch wichtigere Faktoren als PD-L1. Das Alter hatte sich bereits in der multivariaten Analyse mittels Cox-Regression als wichtiger unabhängiger Einflussfaktor dargestellt. Das Modell zeigt jedoch, dass der Einfluss von PD-L1 erst nach T-Kategorie und Alter auftritt und sich zudem überhaupt erst bei einer sehr hoch gewählten p-Wert Grenze zeigt. Daher sollte die Validität dieses Modells in Frage gestellt werden. Bei den resultierenden Risikogruppen unterscheiden sich nur die niedrige und hohe Risikogruppe signifikant voneinander, was ebenfalls zeigt, dass die vorhandene Zahl an Fällen und Ereignissen für eine derartige Untersuchung nicht ausreicht (Abbildung 15, Abschnitt 3.5.2.).

5.1. Zusammenfassung und Ausblick

Die Inzidenz von HPV-getriebenen OPSCC steigt in vielen Ländern stetig an. Obwohl Patienten mit einem HPV-getriebenen OPSCC eine bessere Überlebensrate haben als solche mit HPV-negativen, wird zurzeit bei beiden die gleiche Therapie angewandt. Über eine Deeskalation der Therapie für HPV-getriebene OPSCC wird diskutiert. Zudem werden neue Immuncheckpoint-Inhibitoren der PD1/PD-L1-Achse in palliativen Situationen bei OPSCC eingesetzt, jedoch teilweise ungeachtet der PD-L1 Expression der Tumore.

Ziel dieser Arbeit war es herauszuarbeiten, ob die PD-L1 Expression bei OPSCC eine Rolle spielt. Insbesondere sollten mögliche Unterschiede zwischen HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC näher betrachtet werden. Auf Grund der besonderen Immun-Situation in HPV-getriebenen OPSCC (Abschnitt 1.3.6) erwarteten wir, dass sich auch die Expression von PD-L1 zwischen den Gruppen der HPV-getriebenen und HPV-negativen OPSCC unterscheidet. Zudem sollte betrachtet werden, ob die PD-L1 Expression einen Einfluss auf das Überleben der Patienten hat.

Dazu wurden FFPE Gewebeproben von n=278 OPSCC immunhistochemisch angefärbt und die PD-L1 Expression bestimmt. Diese Expressionsdaten wurden in Korrelation zu klinischen Daten uni- und multivariat mittels Cox-Regression und rekursiver Partitionierung ausgewertet.

Bei 38% der OPSCC wurde eine PD-L1 Expression nachgewiesen, was auf einen PD-L1-vermittelten Immun-Escape in diesen Tumoren hindeutet. Wir konnten ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer PD-L1 Expression und positivem HPV-Status (51% vs. 32% bei HPV-negativen OPSCC, $p=0,002$) zeigen. Dies könnte darauf hindeuten, dass HPV die PD-L1 Expression „nutzt“, um das Immunsystem herunter zu regulieren.

Das 5JÜ beträgt bei PD-L1 Expression 62,2% im Gegensatz zu 44,9% beim Fehlen von PD-L1 auf den Tumorzellen. In der univariaten Analyse zeigt die PD-L1 Expression einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben von Patienten mit OPSCC ($HR=0,632$; $p=0,023$). In der multivariaten Analyse (mittels Cox Regression) konnte der positive Einfluss der PD-L1 Expression nur für Patienten mit HPV-negativen OPSCC bestätigt werden. In der multivariaten Analyse mittels rekursiver Partitionierung zeigte sich die PD-L1 Expression nur im Modell für die HPV-getriebenen OPSCC nach T-Kategorie und Alter als nächstwichtigster Einflussfaktor. Unsere Ergebnisse sprechen für einen Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression und dem HPV-Status, zum Beispiel erklärbar durch eine Virus-getriebene PD-L1 Expression. PD-L1 kann in der Gruppe der

Patienten mit HPV-getriebenen OPSCC, die allgemein ein besseres Gesamtüberleben haben, wenig zur Prognose beitragen. Im Gegensatz dazu haben Patienten mit HPV-negativem OPSCC ein signifikant besseres 5JÜ wenn PD-L1 exprimiert wird ($p=0,043$). In dieser Gruppe mit einem schlechteren Gesamtüberleben hat PD-L1 eine mögliche Bedeutung für die Prognose.

Unsere Ergebnisse könnten dazu beitragen, dass Checkpoint-Inhibitoren in Zukunft auch Teil der kurativen Therapie werden. Zum einen könnte in klinischen Studien getestet werden warum es nur bei manchen Patienten zu einem guten Ansprechen kommt und wie diese Patienten am sichersten zu identifizieren sind. Zum anderen könnten in weiteren Laborexperimenten die molekularbiologischen Abläufe und der Zusammenhang mit Immunzellen genauer beleuchtet werden, die zu dem positiven Einfluss von PD-L1 auf das Gesamtüberleben führen. Dabei wäre es zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Studien untereinander sinnvoll, zusätzlich zu den validierten Antikörpern auch ein standardisiertes Wertungssystem für die PD-L1 Expression zu etablieren.

5.2. Summary and prospects

The incidence of HPV-driven OPSCC is steadily increasing in many countries. Although patients with HPV-driven OPSCC have a better survival rate than those with HPV-negative OPSCC, the same therapy is currently used for both. De-escalation of therapy for HPV-driven OPSCC is under discussion. In addition, new immunocheckpoint inhibitors of the PD-1/PD-L1 axis are used in palliative situations in OPSCC, but partly disregarding the PD-L1 expression of the tumours.

The aim of this study was to determine whether PD-L1 expression plays a role in OPSCC. In particular, possible differences between HPV-driven and HPV-negative OPSCC should be explored. Due to the special immune situation in HPV-driven OPSCC (section 1.3.6), we expected that the expression of PD-L1 differs between the groups of HPV-driven and HPV-negative OPSCC. In addition, it should be considered whether PD-L1 expression has an impact on patient survival.

Therefore FFPE tissue samples of $n=278$ OPSCC were immunohistochemically stained and PD-L1 expression was determined. In correlation to clinical data, the expression data were evaluated uni- and multivariate using Cox regression and recursive partitioning.

PD-L1 expression was detected in 38% of OPSCC, indicating PD-L1-mediated immune escape in these tumours. We could also show a significant association between PD-L1 expression and positive HPV status (51% vs. 32% for HPV negative OPSCC, $p=0.002$). This could indicate that HPV "uses" PD-L1 expression to downregulate the immune system.

The 5-year survival for patients with PD-L1 expression is 62.2% compared to 44.9% in the absence of PD-L1 on tumour cells. In univariate analysis, PD-L1 expression shows a positive effect on overall survival of patients with OPSCC (HR=0.632; $p=0.023$). In multivariate analysis (using Cox regression) the positive influence of PD-L1 expression could only be confirmed for patients with HPV-negative OPSCC. In multivariate analysis using recursive partitioning, PD-L1 expression was the next most important influencing factor only in the model for HPV-driven OPSCC according to T category and age. Our results suggest a relationship between PD-L1 expression and HPV status, e.g. explainable by virus-driven PD-L1 expression. PD-L1 itself may contribute little to the prognosis in the group of patients with HPV-driven OPSCC who generally have better overall survival. In contrast, patients with HPV-negative OPSCC have a significantly better 5-year survival when PD-L1 is expressed ($p=0.043$).

Our results could contribute to checkpoint inhibitors becoming part of curative therapy in the future. On the one hand, clinical trials could be conducted to test why only some patients show a good response and how these patients can be identified most reliably. On the other hand, further laboratory experiments could examine the molecular biological processes in more detail and the relationship with immune cells that lead to the positive influence of PD-L1 on overall survival. To improve the comparability of different studies, it would be useful to establish a standardised evaluation system for PD-L1 expression in addition to the validated antibodies.

6. Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>arteria</i>
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B7-H1	<i>B7 homolog 1</i>
CDK	<i>Cyclin-dependant kinase</i>
CI	Konfidenzintervall
CT	Computertomographie
<i>ctree</i>	<i>conditional inference trees</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOG	<i>Eastern Co-operative of Oncology Group</i>
E-Region	<i>early</i> Region
E-Proteine	<i>early</i> Proteine
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FDG	2-Fluor-2-desoxy-D-glukose
FFPE	<i>formalin-fixed paraffin-embedded tissue</i> , Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
GTDS	Gießener Tumordokumentationssystem
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 α
HLA-I	Humanes Leukozytenantigen-Klasse-I Moleküle
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	Humane Papillomaviren
HR	Hazard Ratio
HS	<i>Horse serum</i> , Pferdeserum
IHC	Immunhistochemie
IFN γ	Interferon- γ
IL-2	Interleukin-2
ITSM	<i>immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
L-Region	<i>late</i> Region
L-Proteine	<i>late</i> Proteine
M	Fernmetastasen

M.	<i>musculus</i>
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
median OS	medianes Gesamtüberleben
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Lymphknotenmetastasen
n	Stichprobengröße
N.	<i>Nervus</i>
n.d.	<i>not determined</i> , nicht ermittelbar
NCR	<i>noncoding region</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>
OPSCC	<i>oropharyngeal squamous cell carcinoma</i>
OS	<i>overall survival</i> , Gesamtüberleben
OT	Objektträger
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC θ	<i>Protein kinase C theta</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
Rb-Protein	Retinoblastom-Protein
RP	rekursive Partitionierung
RT	Raumtemperatur
SHP	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase</i>
S.d.	Standardabweichung
S-Phase	Synthese Phase
T	Tumor
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>

V.	<i>vena</i>
VE	voll entsalztes Wasser
ZAP70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>
5JÜ	5-Jahres-Überleben

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	PD-L1 Expression auf antigenpräsentierenden Zellen	11
Abbildung 2:	PD-L1 Expression in OPSCC im IHC Vorversuch.....	18
Abbildung 3:	PD-L1 Expression bei $\geq 50\%$ der Tumorzellen auf einem OPSCC Flächenschnitt.	24
Abbildung 4:	PD-L1 Expression in OPSCC.....	24
Abbildung 5:	PD-L1 Expression in Bezug auf den Nikotinabusus.	26
Abbildung 6:	Gesamtüberleben der Patienten mit OPSCC nach Kaplan-Meier.	27
Abbildung 7:	Gesamtüberleben der Patienten mit OPSCC nach Kaplan-Meier.	28
Abbildung 8:	Multivariate Modellierung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Überlebenszeit der Patientenstichprobe mittels rekursiver Partitionierung (RP).	34
Abbildung 9:	Kaplan-Meier-Überlebensanalyse aller resultierenden Patienten- gruppen nach RP.....	35
Abbildung 10:	Flussdiagramm zur Risikoabschätzung von Patientengruppen mit OPSCC.....	36
Abbildung 11:	Multivariate Modellierung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Überlebenszeit der Patientenstichprobe mit HPV-negativen OPSCC mittels rekursiver Partitionierung (RP).	37
Abbildung 12:	Kaplan-Meier-Überlebensanalyse aller resultierenden Patienten- gruppen mit HPV-negativem OPSCC nach RP.....	38
Abbildung 14:	Flussdiagramm zur Risikoabschätzung von Patientengruppen mit HPV-negativem OPSCC.....	39
Abbildung 15:	Multivariate Modellierung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Überlebenszeit der Patientenstichprobe mit HPV-getriebenen OPSCC mittels rekursiver Partitionierung (RP).	40
Abbildung 16:	Kaplan-Meier-Überlebensanalyse aller resultierenden Patienten- gruppen mit HPV-getriebenem OPSCC nach RP.....	41
Abbildung 17:	Flussdiagramm zur Risikoabschätzung von Patientengruppen mit HPV-getriebenem OPSCC.....	41
Abbildung 18:	Heterogene PD-L1 Expression auf einem OPSCC Flächenschnitt.....	72

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation nach UICC 7	4
Tabelle 2: UICC 7 Stadieneinteilung	4
Tabelle 3: Chemikalien, die für die Immunhistochemie (Vorversuch) verwendet wurden.	19
Tabelle 4: Puffer, die für die Immunhistochemie (Vorversuch) verwendet wurden. ...	20
Tabelle 5: Geräte, die für die Immunhistochemie (Vorversuch) verwendet wurden. ...	20
Tabelle 6: Tumorcharakteristiken und Risikofaktoren der untersuchten OPSCCs (n=278) in Hinblick auf den HPV-Status.	23
Tabelle 7: PD-L1 Expression von Tumorzellen in OPSCC Gewebeschnitten.....	25
Tabelle 8: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit OPSCC. ...	29
Tabelle 9: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit OPSCC unter Einbeziehung aller Variablen.....	30
Tabelle 10: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit OPSCC nach Ausschluss der Variablen ohne signifikanten Einfluss.....	31
Tabelle 11: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit HPV-negativem OPSCC.....	32
Tabelle 12: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit HPV-getriebenem OPSCC.....	33

9. Literaturverzeichnis

Alberico, S.; Pinzano, R.; Comar, M.; Toffoletti, F.; Maso, G.; Ricci, G.; Guaschino, S. (1996): Trasmissione materno-fetale del papillomavirus umano. In: *Minerva ginecologica* 48 (5), S. 199–204.

Amador-Molina, Alfredo; Hernández-Valencia, José Fernando; Lamoyi, Edmundo; Contreras-Paredes, Adriana; Lizano, Marcela (2013): Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. In: *Viruses* 5 (11), S. 2624–2642.

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.

Ashrafi, G. Hossein; Haghshenas, Mohammad; Marchetti, Barbara; Campo, M. Saveria (2006): E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. In: *International journal of cancer* 119 (9), S. 2105–2112.

Banerjee, N. Sanjib; Genovese, Nicholas J.; Noya, Francisco; Chien, Wei-Ming; Broker, Thomas R.; Chow, Louise T. (2006): Conditionally activated E7 proteins of high-risk and low-risk human papillomaviruses induce S phase in postmitotic, differentiated human keratinocytes. In: *Journal of Virology* 80 (13), S. 6517–6524.

- Bray, Freddie; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Siegel, Rebecca L.; Torre, Lindsey A.; Jemal, Ahmedin (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), S. 394–424.
- Brierley, James; Gospodarowicz, Mary K.; Wittekind, Christian (Hg.) (2017): TNM classification of malignant tumours. Eighth edition. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc, S. 22-30.
- Burtress, Barbara; Harrington, Kevin J.; Greil, Richard; Soulières, Denis; Tahara, Makoto; Castro, Gilberto de et al. (2019): Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. In: *The Lancet* 394 (10212), S. 1915–1928.
- Castellsagué, Xavier; Alemany, Laia; Quer, Miquel; Halc, Gordana; Quirós, Beatriz; Tous, Sara et al. (2016): HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. In: *Journal of the National Cancer Institute* 108 (6), S. 403-406.
- Chemnitz, Jens M.; Parry, Richard V.; Nichols, Kim E.; June, Carl H.; Riley, James L. (2004): SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. In: *Journal of immunology* 173 (2), S. 945–954.
- Chen, Yan-bin; Mu, Chuan-Yong; Huang, Jian-An (2012): Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. In: *Tumori* 98 (6), S. 751–755.
- Cripe, T. P.; Haugen, T. H.; Turk, J. P.; Tabatabai, F.; Schmid, P. G.; Dürst, M. et al. (1987): Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. In: *The EMBO Journal* 6 (12), S. 3745–3753.
- Danos, O.; Katinka, M.; Yaniv, M. (1982): Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. In: *The EMBO Journal* 1 (2), S. 231–236.
- Denko, Nicholas C. (2008): Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. In: *Nature reviews. Cancer* 8 (9), S. 705–713.
- Ding, Dah-Ching; Chang, Ying-Cheng; Liu, Hwan-Wun; Chu, Tang-Yuan (2011): Long-term persistence of human papillomavirus in environments. In: *Gynecologic oncology* 121 (1), S. 148–151.
- Dong, H.; Zhu, G.; Tamada, K.; Chen, L. (1999): B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. In: *Nature medicine* 5 (12), S. 1365–1369.
- Droeser, Raoul A.; Hirt, Christian; Viehl, Carsten T.; Frey, Daniel M.; Nebiker, Christian; Huber, Xaver et al. (2013): Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. In: *European journal of cancer* 49 (9), S. 2233–2242.

- Dyson, N.; Howley, P. M.; Münger, K.; Harlow, E. (1989): The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. In: *Science (New York, N.Y.)* 243 (4893), S. 934–937.
- Elrefaey, S.; Massaro, M. A.; Chiocca, S.; Chiesa, F.; Ansarin, M. (2014): HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice. In: *Acta Otorhinolaryngologica Italica* 34 (5), S. 299–309.
- Fakhry, Carole; Westra, William H.; Li, Sigui; Cmelak, Anthony; Ridge, John A.; Pinto, Harlan et al. (2008): Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. In: *Journal of the National Cancer Institute* 100 (4), S. 261–269.
- Feldman, Rebecca; Gatalica, Zoran; Knezetic, Joseph; Reddy, Sandeep; Nathan, Cherie-Ann; Javadi, Nader; Teknos, Theodoros (2016): Molecular profiling of head and neck squamous cell carcinoma. In: *Head & neck* 38 (1), S. 1625-1638.
- Ferris, Robert L.; Blumenschein, George; Fayette, Jerome; Guigay, Joel; Colevas, A. Dimitrios; Licitra, Lisa et al. (2016): Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. In: *The New England journal of medicine* 375 (19), S. 1856–1867.
- Florin, Luise; Sapp, Cornelia; Streeck, Rolf E.; Sapp, Martin (2002): Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. In: *Journal of Virology* 76 (19), S. 10009–10014.
- Freeman, G. J.; Long, A. J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H. et al. (2000): Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (7), S. 1027–1034.
- Gillison, Maura L.; D'Souza, Gypsyamber; Westra, William; Sugar, Elizabeth; Xiao, Weihong; Begum, Shahnaz; Viscidi, Raphael (2008): Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. In: *Journal of the National Cancer Institute* 100 (6), S. 407–420.
- Grochot, Rafael M.; Brollo, Janaína; Neto, Floriano Riva; Tregnago, Aline C.; Scholze, Cassiano; Norris, Rui et al. (2019): Expression of PD-L1 in cervical carcinoma and its impact on survival associated with T-cell infiltration and FoxP3 expression. In: *Cancer management and research* 11, S. 4597–4605.
- Herbst, Roy S.; Baas, Paul; Kim, Dong-Wan; Felip, Enriqueta; Pérez-Gracia, José L.; Han, Ji-Youn et al. (2016): Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. In: *The Lancet* 387 (10027), S. 1540–1550.
- Hong, Angela M.; Vilain, Ricardo E.; Romanes, Sarah; Yang, Jean; Smith, Elizabeth; Jones, Deanna et al. (2016): PD-L1 expression in tonsillar cancer is associated with human papillomavirus positivity and improved survival: implications for anti-PD1 clinical trials. In: *Oncotarget* 7 (47), S. 77010–77020.
- Horthorn, Thorsten; Zeileis, Achim (2015): partykit: a modular toolkit for recursive partytioning in R. In: *The Journal of Machine Learning Research* 16 (118), S. 3905–3909.
- Hughes, F. J.; Romanos, M. A. (1993): E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. In: *Nucleic acids research* 21 (25), S. 5817–5823.

Huibregtse, J. M.; Scheffner, M.; Howley, P. M. (1993): Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. In: *Molecular and cellular biology* 13 (8), S. 4918–4927.

Hutarew, Georg (2016): PD-L1 testing, fit for routine evaluation? From a pathologist's point of view. In: *memo - Magazine of European Medical Oncology* 9 (4), S. 201–206.

International Agency for Research on Cancer; IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans (1986): Tobacco smoking. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Repr. Lyon: International Agency for Research on Cancer, Volume 38, S. 345-390.

Iwai, Yoshiko; Ishida, Masayoshi; Tanaka, Yoshimasa; Okazaki, Taku; Honjo, Tasuku; Minato, Nagahiro (2002): Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19), S. 12293–12297.

Jawhar, Nazar M. T. (2009): Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. In: *Annals of Saudi medicine* 29 (2), S. 123–127.

Jia, Yi-Qun; Yang, Bo; Wen, Li-Ling; Mu, Wen-Xin; Wang, Zhi; Cheng, Bin (2019): Prognostic value of immune checkpoint molecules in head and neck cancer: a meta-analysis. In: *Aging* 11 (2), S. 501–522.

Jiang, Dongxian; Song, Qi; Wang, Haixing; Huang, Jie; Wang, Hao; Hou, Jun et al. (2017): Independent prognostic role of PD-L1 expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. In: *Oncotarget* 8 (5), S. 8315–8329.

Jiang, Li; Wang, Liang; Li, Peng-Fei; Zhang, Xin-Ke; Chen, Jie-Wei; Qiu, Hui-Juan et al. (2015): Positive expression of programmed death ligand-1 correlates with superior outcomes and might be a therapeutic target in primary pulmonary lymphoepithelioma-like carcinoma. In: *OncoTargets and therapy* 8, S. 1451–1457.

Jones, R. G.; Parsons, M.; Bonnard, M.; Chan, V. S.; Yeh, W. C.; Woodgett, J. R.; Ohashi, P. S. (2000): Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 191 (10), S. 1721–1734.

Keir, Mary E.; Liang, Spencer C.; Guleria, Indira; Latchman, Yvette E.; Qipo, Andi; Albacker, Lee A. et al. (2006): Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (4), S. 883–895.

Kim, Hae Su; Lee, Ji Yun; Lim, Sung Hee; Park, Keunchil; Sun, Jong-Mu; Ko, Young Hyeh 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.

Kim, Se-Heon; Koo, Bon-Seok; Kang, Suki; Park, Kyeongmee; Kim, Haeryoung; Lee, Kyung Ryul et al. (2007): HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. In: *International journal of cancer* 120 (7), S. 1418–1425.

Knuth, Jennifer; Sharma, Shachi J.; Würdemann, Nora; Holler, Claudia; Garvalov, Boyan K.; Acker, Till et al. (2017): Hypoxia-inducible factor-1 α activation in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma cell lines. In: *Oncotarget* 8 (52), S. 89681–89691.

Konishi, Jun; Yamazaki, Koichi; Azuma, Miyuki; Kinoshita, Ichiro; Dosaka-Akita, Hiroto; Nishimura, Masaharu (2004): B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. In: *Clinical cancer research* 10 (15), S. 5094–5100.

Kreimer, Aimée R.; Pierce Campbell, Christine M.; Lin, Hui-Yi; Fulp, William; Papenfuss, Mary R.; Abrahamsen, Martha et al. (2013): Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. In: *The Lancet* 382 (9895), S. 877–887.

Lee, Ju Yeon; Lee, Hyun Tae; Shin, Woori; Chae, Jongseok; Choi, Jaemo; Kim, Sung Hyun et al. (2016): Structural basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. In: *Nature communications* 7, S. 13354.

Li, Ji; Wang, Ping; Xu, Youliang (2017): Prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in patients with head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. In: *PloS one* 12 (6), e0179536.

Lin, David Yin-Wei; Tanaka, Yoshimasa; Iwasaki, Masashi; Gittis, Apostolos G.; Su, Hua-Poo; Mikami, Bunzo et al. (2008): The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (8), S. 3011–3016.

Löning, T.; Ikenberg, H.; Becker, J.; Gissmann, L.; Hoepfer, I.; Zur Hausen, H. (1985): Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. In: *The Journal of investigative dermatology* 84 (5), S. 417–420.

Lyford-Pike, Sofia; Peng, Shiwen; Young, Geoffrey D.; Taube, Janis M.; Westra, William H.; Akpeng, Belinda et al. (2013): Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. In: *Cancer research* 73 (6), S. 1733–1741.

Malm, Ian-James; Bruno, Tullia C.; Fu, Juan; Zeng, Qi; Taube, Janis M.; Westra, William et al. (2015): Expression profile and in vitro blockade of programmed death-1 in human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma. In: *Head & neck* 37 (8), S. 1088–1095.

Martínez-Ramírez, Imelda; Carrillo-García, Adela; Contreras-Paredes, Adriana; Ortiz-Sánchez, Elizabeth; Cruz-Gregorio, Alfredo; Lizano, Marcela (2018): Regulation of Cellular Metabolism by High-Risk Human Papillomaviruses. In: *International journal of molecular sciences* 19 (7).

Matsukura, T.; Kanda, T.; Furuno, A.; Yoshikawa, H.; Kawana, T.; Yoshiike, K. (1986): Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. In: *Journal of Virology* 58 (3), S. 979–982.

McBride, A. A.; Romanczuk, H.; Howley, P. M. (1991): The papillomavirus E2 regulatory proteins. In: *Journal of Biological Chemistry* 266 (28), S. 18411–18414.

McLaughlin, Joseph; Han, Gang; Schalper, Kurt A.; Carvajal-Hausdorf, Daniel; Pelakanou, Vasiliki; Rehman, Jamaal et al. (2016): Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). In: *JAMA oncology* 2 (1), S. 46–54.

- McLaughlin-Drubin, Margaret E.; Park, Donglim; Munger, Karl (2013): Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (40), S. 16175–16180.
- Meng, Ying; Liang, Huyi; Hu, Jianguo; Liu, Shuaibin; Hao, Xiaoming; Wong, Micheal Sze Ka et al. (2018): PD-L1 Expression Correlates With Tumor Infiltrating Lymphocytes And Response To Neoadjuvant Chemotherapy In Cervical Cancer. In: *Journal of Cancer* 9 (16), S. 2938–2945.
- Middleton, Kate; Peh, Woei; Southern, Shirley; Griffin, Heather; Sotlar, Karl; Nakahara, Tomomi et al. (2003): Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. In: *Journal of Virology* 77 (19), S. 10186–10201.
- Mifsud, Matthew; Eskander, Antoine; Irish, Jonathan; Gullane, Patrick; Gilbert, Ralph; Brown, Dale et al. (2017): Evolving trends in head and neck cancer epidemiology: Ontario, Canada 1993-2010. In: *Head & neck* 39 (9), S. 1770–1778.
- Mork, J.; Lie, A. K.; Glattre, E.; Hallmans, G.; Jellum, E.; Koskela, P. et al. (2001): Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. In: *The New England journal of medicine* 344 (15), S. 1125–1131.
- Müller, Tim; Braun, Martin; Dietrich, Dimo; Aktekin, Seher; Höft, Simon; Kristiansen, Glen et al. (2017): PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Oncotarget* 8 (32), S. 52889–52900.
- Munari, Enrico; Zamboni, Giuseppe; Lunardi, Gianluigi; Marchionni, Luigi; Marconi, Marcella; Sommaggio, Marco et al. (2018): PD-L1 Expression Heterogeneity in Non-Small Cell Lung Cancer: Defining Criteria for Harmonization between Biopsy Specimens and Whole Sections. In: *Journal of thoracic oncology* 13 (8), S. 1113–1120.
- Munger, Karl; Gwin, Tyshia K.; McLaughlin-Drubin, Margaret E. (2013): p16 in HPV-associated cancers. In: *Oncotarget* 4 (11), S. 1864–1865.
- Nakamura, Mitsuhiro; Bodily, Jason M.; Beglin, Melanie; Kyo, Satoru; Inoue, Masaki; Laimins, Laimonis A. (2009): Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses. In: *Virology* 387 (2), S. 442–448.
- Nakamura, Sayuri; Hayashi, Kentaro; Imaoka, Yuki; Kitamura, Yuka; Akazawa, Yuko; Tabata, Kazuhiro et al. (2017): Intratumoral heterogeneity of programmed cell death ligand-1 expression is common in lung cancer. In: *PloS one* 12 (10), e0186192.
- Nichols, Anthony C.; Theurer, Julie; Prisman, Eitan; Read, Nancy; Berthelet, Eric; Tran, Eric et al. (2019): Radiotherapy versus transoral robotic surgery and neck dissection for oropharyngeal squamous cell carcinoma (ORATOR): an open-label, phase 2, randomised trial. In: *The Lancet Oncology* 20 (10), S. 1349–1359.
- Nishimura, H.; Okazaki, T.; Tanaka, Y.; Nakatani, K.; Hara, M.; Matsumori, A. et al. (2001): Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. In: *Science* 291 (5502), S. 319–322.
- 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.

- Noch, Evan; Khalili, Kamel (2012): Oncogenic viruses and tumor glucose metabolism: like kids in a candy store. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 11 (1), S. 14–23.
- Noman, Muhammad Zaeem; Desantis, Giacomo; Janji, Bassam; Hasmim, Meriem; Karray, Saoussen; Dessen, Philippe et al. (2014): PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. In: *The Journal of experimental medicine* 211 (5), S. 781–790.
- Olthof, Nadine C.; Speel, Ernst-Jan M.; Kolligs, Jutta; Haesevoets, Annick; Henfling, Mieke; Ramaekers, Frans C. S. et al. (2014): Comprehensive analysis of HPV16 integration in OSCC reveals no significant impact of physical status on viral oncogene and virally disrupted human gene expression. In: *PloS one* 9 (2), e88718.
- O'Sullivan, Brian; Huang, Shao Hui; Su, Jie; Garden, Adam S.; Sturgis, Erich M.; Dahlstrom, Kristina et al. (2016): Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. In: *The Lancet Oncology* 17 (4), S. 440–451.
- Parry, Richard V.; Chemnitz, Jens M.; Frauwirth, Kenneth A.; Lanfranco, Anthony R.; Braunstein, Inbal; Kobayashi, Sumire V. et al. (2005): CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. In: *Molecular and cellular biology* 25 (21), S. 9543–9553.
- Passiglia, Francesco; Bronte, Giuseppe; Bazan, Viviana; Natoli, Clara; Rizzo, Sergio; Galvano, Antonio et al. (2016): PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis. In: *Oncotarget* 7 (15), S. 19738–19747.
- Peduzzi, P.; Concato, J.; Feinstein, A. R.; Holford, T. R. (1995): Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis. II. Accuracy and precision of regression estimates. In: *Journal of clinical epidemiology* 48 (12), S. 1503–1510.
- Pfeifhofer, Christa; Kofler, Kurt; Gruber, Thomas; Ghaffari Tabrizi, Nassim; Lutz, Christina; Maly, Karl et al. (2003): Protein Kinase C θ Affects Ca²⁺ Mobilization and NFAT Activation in Primary Mouse T Cells. In: *Journal of experimental medicine* 197 (11), S. 1525–1535.
- 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.
- Reddy, Opal L.; Shintaku, Peter I.; Moatamed, Neda A. (2017): Programmed death-ligand 1 (PD-L1) is expressed in a significant number of the uterine cervical carcinomas. In: *Diagnostic pathology* 12 (1), S. 45.
- Ribas, Antoni; Shin, Daniel Sanghoon; Zaretsky, Jesse; Frederiksen, Juliet; Cornish, Andrew; Avramis, Earl et al. (2016): PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells. In: *Cancer immunology research* 4 (3), S. 194–203.
- Riella, L. V.; Paterson, A. M.; Sharpe, A. H.; Chandraker, A. (2012): Role of the PD-1 pathway in the immune response. In: *American journal of transplantation* 12 (10), S. 2575–2587.

Rimm, David L.; Han, Gang; Taube, Janis M.; Yi, Eunhee S.; Bridge, Julia A.; Flieder, Douglas B. et al. (2017): A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. In: *JAMA oncology* 3 (8), S. 1051–1058.

Robert, Caroline; Schachter, Jacob; Long, Georgina V.; Arance, Ana; Grob, Jean Jacques; Mortier, Laurent et al. (2015): Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. In: *The New England journal of medicine* 372 (26), S. 2521–2532.

Schmidt, Lars Henning; Kümmel, Andreas; Görlich, Dennis; Mohr, Michael; Bröckling, Sebastian; Mikesch, Jan Henrik et al. (2015): PD-1 and PD-L1 Expression in NSCLC Indicate a Favorable Prognosis in Defined Subgroups. In: *PloS one* 10 (8), e0136023.

Sharma, Shachi Jenny; Wittekindt, Claus; Knuth, Jennifer; Steiner, Dagmar; Wuerdemann, Nora; Laur, Maren et al. (2017): Intraindividual homogeneity of 18F-FDG PET/CT parameters in HPV-positive OPSCC. In: *Oral oncology* 73, S. 166–171.

Sheppard, Kelly-Ann; Fitz, Lori J.; Lee, Julie M.; Benander, Christina; George, Judith A.; Wooters, Joe et al. (2004): PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. In: *FEBS letters* 574 (1-3), S. 37–41.

Shi, Sheng-Jia; Wang, Li-Juan; Wang, Guo-Dong; Guo, Zhang-Yan; Wei, Ming; Meng, Yan-Ling et al. (2013): B7-H1 expression is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma and regulates the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells. In: *PloS one* 8 (10), e76012.

Shimada, Yukiko; Hayashi, Masami; Nagasaka, Yasuhiko; Ohno-Iwashita, Yoshiko; Inomata, Mitsushi (2009): Age-associated up-regulation of a negative co-stimulatory receptor PD-1 in mouse CD4+ T cells. In: *Experimental gerontology* 44 (8), S. 517–522.

Smith, E. M.; Hoffman, H. T.; Summersgill, K. S.; Kirchner, H. L.; Turek, L. P.; Haugen, T. H. (1998): Human papillomavirus and risk of oral cancer. In: *The Laryngoscope* 108 (7), S. 1098–1103.

Sobin, Leslie H.; Gospodarowicz, Mary K.; Wittekind, Christian (2011): TNM Classification of Malignant Tumours. 7th ed. Somerset: Wiley. S. 30-38.

Sottile, Rosa; Pangigadde, Pradeepa N.; Tan, Thomas; Anichini, Andrea; Sabbatino, Francesco; Trecroci, Francesca et al. (2016): HLA class I downregulation is associated with enhanced NK-cell killing of melanoma cells with acquired drug resistance to BRAF inhibitors. In: *European journal of immunology* 46 (2), S. 409–419.

Strobl, Carolin; Malley, James; Tutz, Gerhard (2009): An Introduction to Recursive Partitioning. In: *Psychological methods* 14 (4), S. 323–348.

Svetlana Kintsler, Maria Angela Cassataro, Michael Drosch, Pavlo Holeny, Ruth Knuechel, Till Braunschweig (2019): Expression of programmed death ligand (PD-L1) in different tumors. Comparison of several current available antibody clones and antibody profiling. In: *Annals of Diagnostic Pathology* 41, S. 24–37.

Thompson, R. Houston; Kwon, Eugene D. (2006): Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer. In: *Clinical genitourinary cancer* 5 (3), S. 206–211.

Udall, Margarita; Rizzo, Maria; Kenny, Juliet; Doherty, Jim; Dahm, SueAnn; Robbins, Paul; Faulkner, Eric (2018): PD-L1 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics. In: *Diagnostic pathology* 13 (1), S. 12.

Ukpo, Odey C.; Thorstad, Wade L.; Lewis, James S. (2013): B7-H1 expression model for immune evasion in human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. In: *Head and neck pathology* 7 (2), S. 113–121.

Wagner, Steffen; Sharma, Shachi Jenny; Wuerdemann, Nora; Knuth, Jennifer; Reder, Henrike; Wittekindt, Claus; Klussmann, Jens Peter (2017): Human Papillomavirus-Related Head and Neck Cancer. In: *Oncology research and treatment* 40 (6), S. 334–340.

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.

Weiskopf, Daniela; Weinberger, Birgit; Grubeck-Loebenstein, Beatrix (2009): The aging of the immune system. In: *Transplant international* 22 (11), S. 1041–1050.

William J. Blot, Joseph K. McLaughlin, Deborah M. Winn, Donald F. Austin, Raymond S. Greenberg, Susan Preston-Martin, Leslie Bernstein, Janet B. Schoenberg, Annette Stemhagen, and Joseph F. Fraumeni, Jr. (1988): Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. In: *Cancer research* 48, S. 3282–3287.

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.

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 (1), S. 48-113.

Wolchok, Jedd D.; Kluger, Harriet; Callahan, Margaret K.; Postow, Michael A.; Rizvi, Naiyer A.; Lesokhin, Alexander M. et al. (2013): Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. In: *The New England journal of medicine* 369 (2), S. 122–133.

Wu, Yingcheng; Wei, Jinhuan; Chen, Xia; Qin, Yongwei; Mao, Renfang; Song, Jian; Fan, Yihui (2019): Comprehensive transcriptome profiling in elderly cancer patients reveals aging-altered immune cells and immune checkpoints. In: *International journal of cancer* 144 (7), S. 1657–1663.

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: *International journal of molecular sciences* 21 (15), S. 5228.

Yang, Wanhua; Chen, Peter W.; Li, Haochuan; Alizadeh, Hassan; Niederkorn, Jerry Y. (2008): PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 49 (6), S. 2518–2525.

Yang-Chun, Feng; Zhen-Zhen, Cheng; Yan-Chun, Huang; Xiu-Min, Ma (2017): Association between PD-L1 and HPV status and the prognostic value for HPV treatment in premalignant cervical lesion patients. In: *Medicine* 96 (25), e7270.

Zhao, Yuetao; Wang, Xin-Xin; Wu, Wei; Long, Haixia; Huang, Jiani; Wang, Zhongyu et al. (2019): EZH2 regulates PD-L1 expression via HIF-1 α in non-small cell lung cancer cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 517, S. 201–209.

10. Anhang

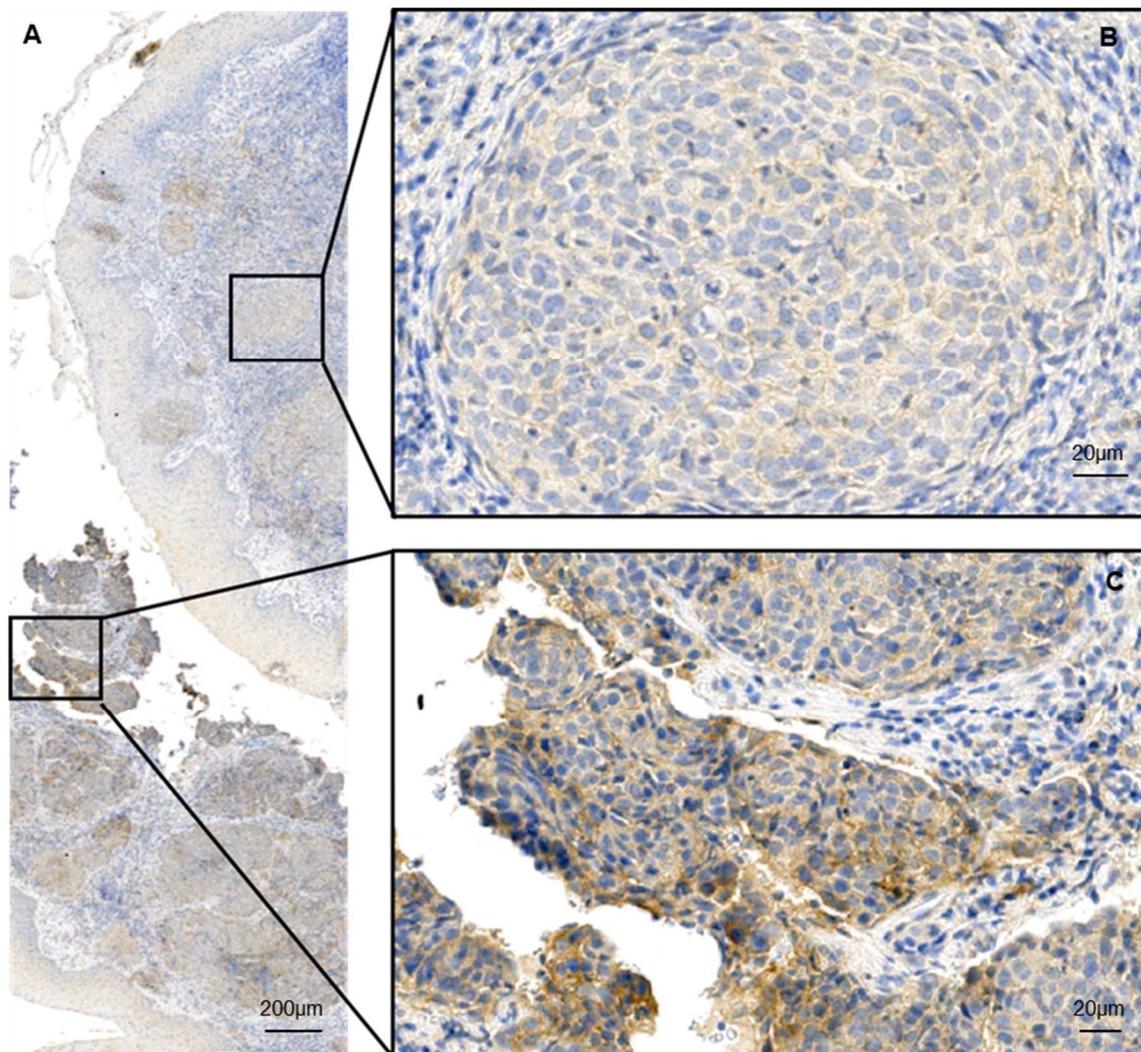


Abbildung 17: Heterogene PD-L1 Expression auf einem OPSCC Flächenschnitt. FFPE Flächenschnitt, mit Hilfe eines anti-PD-L1 Antikörpers (*PD-L1 IHC 28-8 pharmDx*, Dako) immunhistochemisch (braun) und mit Hämatoxylin (blaue Kernfärbung) angefärbt. **A:** Übersichtsaufnahme; **B:** Ausschnittsvergrößerung. Keine Expression von PD-L1 auf der Zelloberfläche. **C:** Ausschnittsvergrößerung. PD-L1 Expression $\geq 50\%$. Über den ganzen Schnitt gemittelt erhält man eine PD-L1 Expression von $\geq 1\%$.

11. Publikationsverzeichnis

Nora Wuerdemann, Sibel E Gültekin, Katharina Pütz, Claus Wittekindt, Christian U Huebbers, Shachi, Hans Ecke, Anna B Schubotz, Stefan Gattenlöhner, Reinhard Büttner, Ernst-Jan Speel, Jens P Klussmann, Steffen Wagner, Alexander Quaas (2020): PD-L1 Expression and a High Tumor Infiltrate of CD8+ Lymphocytes Predict Outcome in Patients with Oropharyngeal Squamous Cells Carcinoma in *International journal of molecular sciences* 21 (15), S. 5228

Anna Beatrice Schubotz, Nora Würdemann, Henrik Böckmann, Stefan Gattenlöhner, Alexander Quaas, Jens P Klußmann, Gregor Wolf, Claus Wittekindt, Steffen Wagner (01.11.2019): Expression des Programmed-Death-Ligand-1 (PD-L1) in Relation zum HPV-Status bei Oropharynxkarzinomen auf dem *Science Day des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen* (Postervortrag)

Anna Beatrice Schubotz, S. Gültekin, S. Wagner, B. Yildirim (07.05.2016): Expression des Programmed Death Ligand 1 (PDL1) auf Tumorzellen HPV-assoziierter Oropharynxkarzinome (OSCC) und Korrelation mit Überlebensdaten auf der *87. Jahresversammlung der Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V.* (Vortrag)

12. Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Claus Wittekindt für die Betreuung meiner Arbeit bedanken. Besonders bei der Entscheidungsfindung hinsichtlich des Vorgehens erhielt ich entscheidende Impulse. Darüber hinaus habe ich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch in Bezug auf das Thema Lehre viel lernen dürfen. Der Aufbau und die Durchführung des studentischen Wahlfachs „HaNgOut – der HNO-Tandemtreff“ haben mir sehr viel Freude bereitet.

Ein besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. Steffen Wagner für die ausgezeichnete Betreuung. Insbesondere der kompetente, freundliche und stetige Austausch haben mir bei der Konzeption und Erstellung meiner Arbeit wesentlich geholfen. Die gemeinsame Themenerarbeitung und die konstruktiven Ideen haben zum erfolgreichen Gelingen beigetragen. Auch für das Korrekturlesen möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. med. Jens Peter Klußmann für die Ermöglichung und die Unterstützung dieser Arbeit und die Förderung meines wissenschaftlichen Interesses bedanken. Ebenso möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für freundliche Atmosphäre und die konstruktiven Diskussionen bedanken. Insbesondere möchte ich mich ganz außerordentlich bei Maike Roth und Jennifer Knuth für die Einführung in die Labortätigkeiten und tolle Unterstützung bei meinen Versuchen bedanken. Nora Würdemann möchte ich für die Einführung in die klinischen Daten danken. Ferner möchte ich mich bei den Mitarbeitenden des Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Gießen für die klinische Datenerhebung bedanken.

Ein großer Dank geht an die Mitarbeitenden des Instituts für Pathologie der Uniklinik Köln unter der Leitung von Prof. Dr. med Alexander Quaas für die immunhistochemische Färbung der TMA und Flächenschnitte. Bei Prof. Dr. Sibel Gültekin aus der Abteilung für Oralpathologie der Fakultät für Zahnheilkunde der Gazi Universität Ankara möchte ich mich für die aufwendige gemeinsame mikroskopische Auswertung bedanken. Ebenfalls möchte ich den Mitarbeitenden der Abteilung für angewandte Tumorbologie des pathologischen Instituts der Universität Heidelberg für die Erhebung des HPV-Status danken. Ein Dank geht auch an das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. Stefan Gattenlöhner für die Bereitstellung der FFPE Gewebeproben und Unterstützung des Projekts.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie: Meinen Eltern Prof. Dr. med. Rolf und Gunhild Schubotz, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer unterstützt haben

und ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Meinem Freund Hendrik Macke, der mir menschlich so wie fachlich in allen Lebenslagen beigestanden hat. Sigrid Macke für den stetigen motivierenden Zuspruch und das mühevollen Korrekturlesen.

Danken möchte ich außerdem meinen Freunden, die mich während meines Studiums und dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.