

Aus der
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Ehrenfeld

**Untersuchung neuer Aspekte des klinisch-pathologischen
Verhaltens von oralen Plattenepithelkarzinomen in
Abhängigkeit von Lokalisation und immun-histochemischem
Expressionsprofil**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alix Pianka

aus
Würzburg
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Dr. Sven Otto
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Hjalmar Hagedorn PD Dr. Philipp Baumeister
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. Dr. Matthias Tröltzscher
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	09.07.2020

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Alix Pianka

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Untersuchung neuer Aspekte des klinisch-pathologischen Verhaltens von oralen Plattenepithelkarzinomen in Abhängigkeit von Lokalisation und immunhistochemischem Expressionsprofil“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

10.07.2020

Alix Pianka

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
2.	PUBLIKATIONSLISTE	5
3.	EINLEITUNG	6
	Darstellung des Forschungsvorhabens	6
	Die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren im Mundhöhlenkarzinom	7
	HPV in OSCC	10
	LKM bei OSCC	11
	Der Nachweis von PD-L1 und PD-1 in OSCC	13
	Darstellung des Eigenanteils an der Arbeit	15
4.	ZUSAMMENFASSUNG	16
	Publikation A ²²	16
	Publikation B ⁵	17
	Publikation C ¹⁴³	17
5.	SUMMARY	19
	Publication A ²²	19
	Publication B ⁵	20
	Publication C ¹⁴³	20
6.	PUBLIKATION A	21
7.	PUBLIKATION B	22
8.	LITERATURVERZEICHNIS	23
9.	DANKSAGUNG	37

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

cN0	Klinisch keine Anzeichen für Lymphknotenbefall
cN+	Klinisch positiver Lymphknotenbefall
G	Grading
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma / Kopf-Hals-Karzinom
HPV	Humane Papillomviren
JÜL	Jahres-Überleben
L	Lymphgefäßinvasion
LKM	Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetastasierung
MSCC	Maxillary Squamous Cell Carcinoma / Karzinom der Maxilla
N	Lymphknotenstatus
PD-1	Programmed Cell Death Receptor 1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
PD-1+ TIL	Programmed Cell Death Receptor 1 positive tumor infiltrating lymphocytes / - Tumor infiltrierende Lymphozyten
OSCC	Oral squamous cell carcinoma/ Mundhöhlenkarzinom
T	Tumor-Stadium
V	Gefäßinvasion
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

2. PUBLIKATIONSLISTE

- A. **Pianka A**, Knösel T, Probst F, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Isoforms: Are They Present in Oral Squamous Cell Carcinoma? *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2015;73(5):897-904.
- Auszeichnung: „Laskin Best Paper Award 2015“*
- B. Troeltzsch M, Knoesel T, Woodlock T, **Pianka A**, et al. Are There Clinical or Pathological Parameters of Maxillary Oral Squamous Cell Carcinoma With an Influence on the Occurrence of Neck Node Metastasis? An Appraisal of 92 Patients. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2016;74(1):79-86.

3. EINLEITUNG

Darstellung des Forschungsvorhabens

Weltweit erkranken über 300 000 Menschen pro Jahr an einem Mundhöhlenkarzinom (Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC).¹ Das OSCC zeigt ein aggressives Verhalten, das sowohl durch regelmäßige und frühe lymphogene Metastasierung als auch durch hohe Rezidivraten gekennzeichnet ist.²⁻⁴ Unabhängig von der Lokalisation des OSCC wird aktuell von einer okkulten zervikalen Metastasierungsrate von 20% - 40% ausgegangen.⁵ Dies führt zu einer vergleichsweise schlechten Prognose für die Patienten.⁶ Trotz Verbesserungen in der chirurgischen und der Strahlen- und Chemotherapie konnten die Überlebensraten speziell bei fortgeschrittenen Tumorstadien über die Zeit kaum verlängert werden.^{2,7-12} Studien prognostizieren zudem einen Anstieg der Inzidenz und der damit verbundenen absoluten Mortalitätsrate von OSCCs für die nächsten Jahre von bis zu 20%.¹³

Um das Therapieansprechen sowie die Entwicklung von neuen Therapien zu ermöglichen, ist es entscheidend, die Karzinogenese des OSCCs und dessen klinische Auswirkungen tiefgreifender zu verstehen. Bisher wurden vor allem makroskopische Aspekte des OSCC als wichtige prognostische Parameter identifiziert. Dabei handelt es sich um die Faktoren Tumogröße (T-Stadium), das Vorhandensein von Lymphknoten- (N-Stadium) und Fernmetastasen (M-Stadium). In der neuen Version des TNM-Systems für das OSCC wurde nun auch die Tumordicke des Primärtumors in die T-Stadieneinteilung mit aufgenommen.¹⁴ Obwohl der prognostische Einfluss histologischer und insbesondere molekularer Parameter in der Literatur diskutiert wird,¹⁵⁻¹⁹ werden diese nicht regelhaft zur Risikoanalyse herangezogen. So werden zwar der histologische Differenzierungsstatus (G-Status), das Auftreten von Lymph- und Blutgefäßinvasion durch Zellen des Primärtumors (L- und V-Status) in pathologischen Berichten erhoben, sie finden aber aktuell keine wesentliche Beachtung für das adjuvante Therapiedesign.²⁰ Zahlreiche Arbeitsgruppen beschäftigen sich aktuell mit der Fragestellung der genaueren Risikoanalyse des OSCC. Folgende Ansätze werden dabei verfolgt:

1. Exaktere Aufschlüsselung makroskopischer Aspekte: Ziel dieses Ansatzes ist es, herauszufinden, ob OSCC an unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb der Mundhöhle spezielle Entitäten mit eigenständigem biologischen Verhalten darstellen könnten.^{5,21}

2. Genauere Analyse histologischer Parameter und immunhistochemischer Expressionsprofile von Zellen des OSCC und Korrelation mit klinischen und prognostischen Charakteristika.^{22,23}
3. Untersuchung des Genoms des OSCC mit Mutations- und Methylierungsanalyse und Korrelation mit klinischen und prognostischen Charakteristika.²⁴

Die ersten zwei Aspekte wurden in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen. Das konkrete Ziel der Arbeit war es, zur Klärung der Frage beizutragen, ob Zellen des OSCC ein charakteristisches immunhistochemisches Expressionsprofil aufweisen, und ob dieses eine Relevanz für klinische und prognostische Parameter besitzt. Zusätzlich sollte näher untersucht werden, ob es in diesen Fragestellungen lokalisationsabhängige Unterschiede gibt. Um eine gerichtete Analyse zu gewährleisten, wurden immunhistochemische Expressionsprofile, deren prognostische und klinische Relevanz für Karzinome anderer Organsysteme bereits gezeigt wurde,²⁵⁻³⁰ auf das OSCC übertragen.

Die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren im Mundhöhlenkarzinom

Für ein Malignom ist die Neubildung von Blutgefäßen, die sogenannte „Angiogenese“ essentiell, um die Versorgung mit Sauerstoff und weiteren Nährstoffen und damit sein progressives Wachstum sicherzustellen.³¹⁻³⁴ Daher zielen neuere Antikörper-basierende Therapieansätze darauf ab, speziell diesen Vorgang zu blockieren und somit das Tumorwachstum einzudämmen.^{35,36} Eine Proteinfamilie, die dabei eine zentrale Rolle spielt, ist die des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mit seinen Signalmolekülen VEGF-A, -B, -C, -D, E und PIGF (Placenta Growth Factor) und dessen Rezeptoren VEGF-R1, -R2 und -R3.³⁶⁻³⁸

Insgesamt werden dieser Proteinfamilie vielfältige Funktionen zugeschrieben, in dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich deren Rolle im Tumorgewebe betrachtet. VEGF wird hier von Tumor- und von Bindegewebszellen produziert und wirkt über parakrine und autokrine Signalwege.^{39,40} Beispielsweise wird die Gefäßproliferation gefördert, indem VEGF-A an VEGF-R2 auf Endothelzellen bindet und dabei ein mitogenes Signal induziert. Die Expression von VEGF wird dabei durch Hypoxie im Gewebe³⁸ und durch Onkogene wie dem Endothelial Growth Factor Receptor reguliert.^{41,42} Ferner hemmt VEGF die Apoptose von Tumorzellen, indem er die Expression von anti-apoptotischen Proteinen (Bcl-2 und A1) induziert.⁴³ Für viele Tumorentitäten konnte mittlerweile gezeigt werden, dass eine Überexpression von VEGF und seinen Rezeptoren mit einer vergleichsweise

schlechteren Prognose vergesellschaftet ist. Shih et al.⁴⁴ zeigten für Ösophaguskarzinome, dass eine Überexpression von VEGF mit einem schlechteren Outcome einhergeht. Volm et al.⁴⁵ wiesen nach, dass VEGF ein prognostischer Marker für Plattenepithelkarzinome der Lunge ist und Gasparini⁴⁶ zeigte dies für Brustkrebs.

Für OSCCs wurde die Expression von VEGF bereits in vielen Studien untersucht. Daher ist bekannt, dass eine Überexpression von VEGF mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist^{18,19,47} und VEGF als unabhängiger prognostischer Faktor herangezogen werden kann.⁴⁸⁻⁵⁰ Diese Ergebnisse werden von weiteren Studien⁵¹⁻⁵³ gestützt, da die VEGF Expression während des Übergangs von normaler Mukosa in neoplastisches Gewebe hin zu OSCC steigt. Ferner steigt die VEGF Expression mit der Tumogröße⁵⁴ und korreliert mit einem positiven Lymphknotenstatus⁵⁵. Die VEGF Expression wird in Hinblick auf das Tumorgrading (G) kontrovers diskutiert: Kukreja et al.⁵⁶ und Kapoor und Deshmukh⁵⁴ zeigen, dass VEGF unabhängig von G ist. Varma et al.⁵³ berichten, dass schlecht differenzierte OSCC die höchsten VEGF-Expressionsniveaus aufweisen, wohingegen Margaritescu et al.⁵² gegenteilig herausfinden, dass in schlecht differenzierten OSCCs die VEGF-Expression reduziert wird. Ein möglicher Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist die kumulierte Untersuchung von VEGF an Stelle der separaten Betrachtung der einzelnen Isoformen von VEGF, da diese möglicherweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten hochreguliert werden.

Wird die Expression der VEGF-Signalmoleküle in OSCCs separat untersucht, zeigt sich, dass VEGF-A signifikant mit dem Tumorstadium (T) und dem Patientenalter⁵⁷, Lymphknotenmetastasen (LKM)⁵⁸, und einer schlechteren Prognose⁵⁹ korreliert. Im Gegensatz dazu zeigte Nayak et al.⁶⁰, dass die Expression von VEGF-A keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben hat. Für VEGF-C konnte nachgewiesen werden, dass dessen Expression signifikant mit LKM korreliert^{58,61-65}, aber keinen prädiktiven Wert für die Erkennung von okkulten LKM hat.^{62,66} Ferner ist die VEGF-C-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert^{58,59} und ein starker prädiktiver Marker für eine zukünftige lymphogene Metastasierung.⁶⁷

Im Gegensatz dazu ist die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren in OSCCs deutlich weniger gut untersucht und die Studienlage unzureichend. Bisher konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen VEGF-R3 und LKM gezeigt werden.^{55,68} Michi et al.³⁷ zeigen, dass OSCCs die Angiogenese unterstützen, indem sie VEGF und VEGF-R1 auf Endothelzellen exprimieren. Tanigaki et al.⁶⁴ konnten hingegen keinen Einfluss von VEGF-R1 oder R3 auf das Überleben von OSCCs Patienten nachweisen. In Bezug auf die

Rezeptorexpression und das Tumorgrading ist die Studienlage uneinig, da Sato und Takeda⁶⁹ eine signifikant höhere VEGF-R2 Expression in schlecht differenzierten OSCCs zeigen und Stinga et al.⁷⁰ diesen Zusammenhang für VEGF-R2 in besonders gut differenzierten OSCCs nachweisen. Ebenfalls zeigten Stinga et al.⁷⁰, dass die VEGF-R1-Expression mit moderat differenzierten OSCCs korreliert.

Die Expression von VEGF-Rezeptoren in anderen epithelialen Tumorentitäten ist bereits umfangreicher untersucht. Beispielsweise wurde für das kolorektale Karzinom gezeigt, dass die VEGF-R1 Expression mit einem schlechteren Überleben korreliert^{27,39}. Dies gilt ebenso für das Magenkarzinom²⁸, sowie für das Nasopharynxkarzinom⁷¹. Beim Nierenkarzinom ist die VEGF-R Expression in Tumorzellen im Vergleich zu normalem Nierengewebe höher und mit T und dem Überleben assoziiert.⁷² In Prostatagewebe steigt die VEGF-R Expression in der Transformation von gesundem hin zu malignem Gewebe.⁷³ Für das Ösophaguskarzinom⁷⁴ und das hepatzelluläre Karzinom⁷⁵ konnte ebenfalls eine Überexpression von VEGF-R1 und -R2 in Tumorzellen nachgewiesen werden.

Hingegen wurde für Ovarialkarzinome²⁶, Endometriumkarzinome⁷⁶ und Lungenkarzinome^{25,45,77,78} gezeigt, dass die VEGF-R und speziell die VEGF-R1 Expression keinen Einfluss auf den Outcome hat. Ebenso hat die VEGF-R1 Expression in HNSCC keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose der Patienten.⁷⁹ Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von Lalla et al.⁸⁰, die zeigt, dass die Expression von VEGF-R1, R2, R3 in Tumorzellen des HNSCC signifikant höher ist als in Endothelzellen und stützt damit die These des autokrinen Signalwegs. Die Korrelation zwischen der Expression von VEGF und seinen Rezeptoren in OSCCs ist ebenfalls unzureichend untersucht. Für das Ösophaguskarzinom konnte ein Zusammenhang nachgewiesen werden.⁸¹

Indessen wurden Antikörper entwickelt, die zielgenau an VEGF und seinen Rezeptoren binden und diese in ihrer Funktion blockieren. Durch diese „targeted therapy“ bieten sich neue Möglichkeiten der Krebstherapie. Bevacizumab ist ein Anti-VEGF-Antikörper, der bereits in der Kombination zur herkömmlichen Therapie von Darm-, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen-, Brust-, Nieren- und Ovarialkarzinomen in Deutschland zugelassen ist.⁸² Sunitinib ist ein Vertreter der Tyrosinkinase-Inhibitoren, die durch die Hemmung von VEGF-Rezeptoren -R1, R2 und R3 seine antiangiogenetische und antiproliferative Wirkung entfaltet. Dieser ist derzeit neben anderen Tyrosinkinase-Inhibitoren bereits für die Therapie von Nierenzellkarzinomen, neuroendokrinen Tumoren und gastrointestinalen Strumatumoren zugelassen.⁸³ Weitere Antikörper befinden sich derzeit in der klinischen Entwicklung. Die Kombination der Therapie von

OSCCs um VEGF- und VEGF-R-Antagonisten stellt daher einen vielversprechenden Ansatz dar,⁸⁴⁻⁸⁶ weshalb die Publikation A: „Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Isoforms: Are They Present in Oral Squamous Cell Carcinoma?, in: Journal of oral and maxillofacial surgery, 2015“²² für ein besseres Verständnis der Beziehung zwischen VEGF-R und OSCCs sorgen möchte, indem es die Expression von VEGF-R in OSCC und dessen klinische Relevanz untersucht. Zusammenfassend zeigte sich eine signifikante Korrelation von VEGF-R1 und der Tumogröße sowie mit der Exposition von allgemeinen Risikofaktoren wie Nikotin- und Alkoholabusus (siehe Abschnitt 5 Zusammenfassung – Publikation A).

HPV in OSCC

Für die Karzinogenese von HNSCC und speziell für die des Oropharynxkarzinoms konnte bereits der Einfluss der Humanen Papillomviren (HPV) und dessen Subtypen nachgewiesen werden.^{87,88} Ein positiver HPV-Status des Tumors spielt insbesondere dann eine Rolle, wenn die klassischen Risikofaktoren wie exzessiver Alkoholgenuss und starker Nikotinkonsum nicht nachweislich sind.⁸⁹ Für HNSCC stellt ein positiver HPV-Status einen prognostisch günstigen Faktor da.⁹⁰ Vermutlich ist dies durch ein besseres Chemotherapieansprechen⁹¹ und ein günstigeres Tumorverhalten bedingt, das sich in einem langsameren Progress und geringeren Rezidivraten zeigt.⁹² Da OSCCs in vielen Studien nicht als eigene Tumorentität betrachtet werden, sondern zusammen mit anderen HNSCCs untersucht werden, wurde häufig abgeleitet, dass HPV auch für OSCCs einen Einflussfaktor darstellt. Für OSCC wird diese Beziehung in der Literatur kontrovers diskutiert: Einige Studien zeigen eine positive Korrelation zwischen dem HPV-Status und dem Auftreten von OSCCs^{93,94} und bezeichnen den HPV-Status sowohl als einen unabhängigen Risikofaktor für OSCCs⁹⁵, der für ca. ein Drittel aller OSCC verantwortlich ist⁹⁶, als auch als einen prognostischen Marker für OSCCs^{97,98}.

Hingegen zeigen Ndiaye et al.⁹⁹ in einer Meta-Analyse, dass HPV vor allem in Oropharynxkarzinomen eine Rolle spielt und Castellsagué et al.¹⁰⁰ beschreiben in einer sehr umfangreichen Studie, dass HPV-Positivität nur bei unter 4,5% der OSCC nachweisbar ist. Ebenso ließ sich kein Einfluss auf das TNM-Stadium⁸⁹ oder auf die Prognose von Patienten mit OSCC zeigen.^{87,101} Letzteres würde mitunter erklären, warum HPV-positive Oropharynxkarzinome im Gegensatz zu OSCCs oder anderen HNSCCs ein besseres Therapieansprechen und eine daraus resultierende bessere Prognose aufweisen. Daher sollte in der Publikation A auch die Hypothese untersucht werden, ob

der HPV-Status bei OSCC einen Einfluss auf klinische Parameter hat (siehe Abschnitt 5 Zusammenfassung – Publikation A).

LKM bei OSCC

Ein Faktor, der die Prognose von Patienten mit OSCC wesentlich beeinflusst, ist die Metastasierung in regionäre zervikale Lymphknoten.^{6,102} Daher wird das Überleben häufig in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus N bei Diagnosestellung bzw. nach histopathologischem Befund angegeben. So sinkt das 5-Jahres-Überleben (JÜL) für Patienten mit positivem Lymphknotenstatus von 42,8% für N0 auf 17,5% für N+ (N+ setzt sich hier zusammen aus N1 = 37,7% 5-JÜL; N2 = 15,8% 5-JÜL und N3 = keiner der Patienten überlebte mehr als 2 Jahre).⁶

Bei Diagnosestellung weisen bereits über 50%^{6,103} der Patienten einen klinisch positiven Befund der regionalen Lymphknoten (cN+) auf. Bei 20% - 40% der Patienten ohne klinische Anzeichen für einen Lymphknotenbefall (cN0) stellt sich im Verlauf eine okkulte Metastasierung der regionalen Lymphknoten heraus^{6,102-105}, und ein wesentlicher Anteil davon zeigt bereits ein extrakapsuläres Wachstum.¹⁰⁴

Da der Therapieerfolg und damit die Prognose des Patienten entscheidend von der Entfernung der regionalen Halslymphknoten abhängt, wird auch bei cN0 eine elektive Neck-Dissection empfohlen.¹⁰⁶ Die Strategie bei Patienten mit cN0 abzuwarten, bis ein klinisch auffälliger Lymphknotenbefund eintritt und dann erst eine therapeutische Neck-Dissection durchzuführen, hat keinen Vorteil gezeigt. Sie geht mit einer für den Patienten deutlich reduzierten Prognose¹⁰² bzw. mit erhöhten Rezidivraten und einem verringerten krankheitsfreien Überleben einher.¹⁰⁷ Dennoch war die Studienlage für das klinische Vorgehen bei Patienten mit OSCC cN0 im Stadium 1 und 2 hier lange uneinheitlich.¹⁰⁸ Außerdem darf nicht vernachlässigt werden, dass eine Neck-Dissection auch Nebenwirkungen für den Patienten wie Wundheilungsstörung, Funktions einschränkungen der Schultermobilität und Lymphabflusstörungen mit sich bringen kann, die die Lebensqualität stark einschränken können. Daher ist es weiterhin nötig, Faktoren zu ermitteln, die eine bessere Vorhersage über okkulte oder zukünftige LKM treffen lassen, um so langfristig die Therapie des OSCC patientenindividuell anpassen zu können und therapieinduzierte Nebenwirkungen zu vermeiden.

Bei ca. 9% der OSCC handelt es sich um Karzinome der Maxilla (MSCC).¹⁰⁹ Studien geben Hinweise darauf, dass sich diese Tumorentität von anderen OSCCs in verschiedenen Punkten unterscheidet.¹¹⁰ Aufgrund der unterschiedlichen Zuordnung wird manchmal

ein differentes Therapievorgehen, wie „watch and wait“ oder die Entfernung von jugulodigastrischen Lymphknoten begründet.^{111,112} Daher wurde in der Vergangenheit bei Patienten mit MSCC und cN0 häufig keine elektive Neck-Dissection durchgeführt, wenngleich es bedingt durch die geringe Patientenzahl an umfangreichen und vergleichbaren Studien mangelt und es keine einheitlichen Therapieempfehlung für diese Fälle gibt.¹⁰⁶ In den letzten Jahren häufen sich jedoch Studien, die eine elektive Neck-Dissection bei klinisch unauffälligem Lymphknotenstatus (cN0) bei MSCC empfehlen.¹¹²⁻¹¹⁵

In der Publikation B: „Are There Clinical or Pathological Parameters of Maxillary Oral Squamous Cell Carcinoma With an Influence on the Occurrence of Neck Node Metastasis? An Appraisal of 92 Patients, in: In Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2016“⁵, wurde daher untersucht, welche klinischen und pathologischen Faktoren einen Einfluss auf das Auftreten von LKM bei MSCC haben. Beispielsweise wird in der Literatur diskutiert, ob die Lokalisation des Tumors, d.h. die Herkunft des Gewebes bedingt durch die embryonale Entwicklung und seine zugehörigen Lymphabflusswege, einen Einfluss auf das lymphogene Metastasierungsmuster haben. Es wird beschrieben, dass Tumore des posterioren Gaumens ein höheres Risiko für LKM haben.^{112,116} Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass in der Literatur keine einheitliche Sicht über die Zuordnung von Tumoren nach ihrer anatomischen Lokalisation herrscht, bzw. keine eindeutigen Grenzen existieren, die anterior oder posterior in der Mundhöhle genau definieren.¹¹⁷

Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse weiterer Studien, die zeigen, dass ein signifikanter Anteil von MSCC bei Diagnosestellung LKM aufweist, oder diese im Verlauf entwickeln wird und sich bei einem wesentlicher Anteil der Patienten mit klinisch unauffälligem Lymphknotenbefund okkulte Metastasen zeigen.^{109,111,118-120} Durch das aggressive Verhalten des MSCC und dessen Ähnlichkeit zu den übrigen OSCC wird zunehmend empfohlen, eine elektive Neck-Dissection auch bei cN0 Patienten mit MSCC durchzuführen, da somit die Prognose für die Patienten wesentlich verbessert werden kann.^{109,111,112,114,118,119,121,122} Es ist also von weitreichender Bedeutung, Klarheit über assoziierte Faktoren zu schaffen und die Therapie dementsprechend anzupassen.

Zusammenfassend erwiesen sich im untersuchten Patientenkollektiv sowohl die anatomische Lage als auch die histologische Graduierung für die Entwicklung von LKM und damit für die Prognose des Patienten als relevant⁵ (siehe Abschnitt 5 Zusammenfassung – Publikation B).

Der Nachweis von PD-L1 und PD-1 in OSCC

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis von Programmed Cell Death Ligand-1 (PD-L1) und Programmed Cell Death Receptor-1 (PD-1) in OSCC. Sie ist nicht Gegenstand des vorgelegten Promotionsprojekts, wird aus Gründen der Vollständigkeit hier aber dennoch aufgeführt, da es sich inhaltlich um eine Fortentwicklung der Fragestellung handelt.

Trotz kurativem Therapieversuch erleiden viele Patienten mit HNSCC ein Lokalrezidiv (10% bis 33%)^{2-4,10} oder ein Zweitkarzinom (21% bis 25%)². Durch die vorangegangene Behandlung ist eine erneute Bestrahlung oder chirurgische Resektion oft nicht oder nur mit erhöhten Komplikationsraten und erhöhter Morbidität möglich. Für die Salvage-Chirurgie zeigt sich beispielsweise, dass von Patienten im Stadium III nach zwei Jahren noch rund 30% am Leben sind. Im Stadium IV versterben bereits 50% der Patienten in den ersten 9 Monaten nach Salvage-Therapie und dabei erleiden zudem ca. 30% der Patienten signifikante Komplikationen der Therapie.⁹

Daneben leiden ca. 60%-70%¹²³ der HNSCC-Patienten bereits bei Diagnosestellung unter einem lokoregionär fortgeschrittenen Tumor, der mit einer alleinigen chirurgischen Erstlinientherapie häufig nicht mehr sinnvoll zu behandeln ist. Diesen Patienten konnte bisher teilweise nur noch eine Strahlentherapie ggf. in Kombination mit einer Chemotherapie angeboten werden. Allerdings sind die Ansprechraten hier meist nicht zufriedenstellend. Beispielsweise erzielen platinhaltige Chemotherapieregime des HNSCC in Kombination mit 5-FU nur Ansprechraten von 30%^{124,125} bis 36%¹²⁶. Bei einer kombinierten Radiochemotherapie bei fortgeschrittenem HNSCC zeigten sich Progressionsraten von ca. 50% nach drei Jahren Beobachtungsdauer nach Therapie.¹²⁷ Um den Progress oder ein Rezidiv der Erkrankung dennoch aufzuhalten, sollte bei nicht-Ansprechen auf eine Zweitlinientherapie umgestellt werden. In der Zweitlinientherapie des HNSCC kommen seit kurzem neue Therapieansätze wie Immuncheckpoint-Inhibitoren zum Einsatz.¹²⁸⁻¹³¹ Diese zielen darauf ab, Signalwege zu blockieren, die Tumoren nutzen, um vom körpereigenen Immunsystem unerkannt zu bleiben. Einer dieser Signalwege ist die Inaktivierung von umliegenden T-Zellen durch Tumorzellen.^{132,133} Dabei exprimieren Tumorzellen PD-L1, der PD-1 auf T-Zellen bindet und so deren Inaktivierung in Gang setzt.¹³⁴ Die so induzierte Immuntoleranz nutzt der Tumor, um sich weiterhin „unbemerkt“ auszubreiten.¹³⁵ Die eigentliche physiologische Funktion des PD-L1/PD-1 Signalwegs liegt darin, den Körper vor einer überschießenden

Immunantwort zu schützen, indem T-Zellen deaktiviert werden bzw. deren Apoptose induziert wird.^{136,137}

Die Blockierung des PD-L1/PD-1 Signalwegs wird bereits seit einigen Jahren in verschiedenen Tumorentitäten erfolgreich eingesetzt:

- Bei Patienten mit malignem Melanom und nicht resezierbaren Metastasen werden PD-1-Antikörper wie Pembrolizumab und Nivolumab in der Monotherapie oder in der Kombinationstherapie eingesetzt.¹³⁸
- Für das fortgeschrittene nicht-kleinzelige Lungenkarzinom und den Nachweis von mehr als 50% einer PD-L1-Expression wird Pembrolizumab als Erstlinientherapie empfohlen.¹³⁹
- Beim metastasierten klarzelligen Nierenzellkarzinom wird in der Zweitlinientherapie Nivolumab eingesetzt.¹⁴⁰
- Beim metastasiertem Urothelkarzinom werden in der Erst- und Zweitlinientherapie die PD-1/PD-L1-Antikörper Atezolizumab und Pembrolizumab eingesetzt.¹⁴¹

In der Zweitlinientherapie des HNSCC werden bisher PD-1 Antikörper wie Pembrolizumab oder Nivolumab eingesetzt.¹³⁰ Hier wurde bereits beschrieben, dass der Einsatz von Nivolumab das gesamte und progressionsfreie Überleben bei rezidiviertem und Platin-refraktärem HNSCC im Vergleich zur Standardtherapie signifikant verbessert.¹²⁹ In einer weiteren Studie wurde dargestellt, dass dies nicht nur für die reine Überlebenszeit gilt, sondern dass auch die Lebensqualität der Patienten verbessert wird.¹⁴² Für Pembrolizumab konnten Ansprechraten von 18% bei rezidiviertem oder metastasiertem HNSCC sowie eine gute Verträglichkeit der Therapie nachgewiesen werden.¹³⁰

Zusammenfassend stellen PD-L1 und PD-1 Antikörper eine vielversprechende neue Therapie für Patienten mit rezidiviertem oder metastasiertem HNSCC dar. Da aber nicht jeder Patient auf diese Therapie anspricht und ggf. sogar Nebenwirkungen davon erleiden kann, ist es wichtig, die Expression von PD-L1 und PD-1 in Tumoren näher zu untersuchen. In der Publikation C: "Is There Evidence for the Presence and Relevance of the PD-1/PD-L1 Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma? Hints From an Immunohistochemical Study, in: Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2017"²³ wurde daher die Expression dieser Proteine in OSCCs untersucht, um Aussagen treffen zu können, in wie weit dieser Signalweg dort eine Rolle spielt und ob sich Unterschiede in der Expression in Bezug auf klinische Parameter zeigen. Zusammenfassend konnten in

29% der OSCC-Präparate die Expression von PD-L1 und in 83% der Präparate hohe Raten an PD-1+ TIL nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die Expression von PD-L1 signifikant mit der anatomischen Herkunft des OSCC, dem Nachweis von zervikalen LKM und dem Nachweis von PD-1+ TIL korreliert¹⁴³ (siehe Abschnitt 5 Zusammenfassung – Publikation C).

Darstellung des Eigenanteils an der Arbeit

Die medizinische Doktorandin Alix Pianka hat das Themengebiet der Dissertation gemeinsam mit Dr. Dr. Matthias Tröltzscher entwickelt. Dabei erfolgte die Einarbeitung in die Thematik sowie die Vorbereitung der zu untersuchenden Fragestellungen selbstständig. In der Publikation A und C konnte auf ein bereits bestehendes Patientenkollektiv zurückgegriffen werden, in der Publikation B wurde dieses von der Doktorandin selbstständig erhoben. Das Anfärben der pathologischen Präparate der drei Publikationen wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Knösel und dessen Mitarbeitern übernommen. Die histologische Auswertung der Präparate erfolgte mit fachlicher Unterstützung von Prof. Dr. Knösel. Die daran anschließende statistische Auswertung der Daten erfolgte durch die Doktorandin in Rücksprache mit Dr. Dr. Matthias Tröltzscher. Die Publikationen wurden von der Doktorandin in Rücksprache mit Dr. Dr. Matthias Tröltzscher verfasst. Alle weiteren Koautoren übernahmen eine unterstützende Tätigkeit in der Durchführung der Arbeit. Herr Timothy Woodlock, M.D. übernahm freundlicherweise das Korrekturlesen der englischen Texte für die Publikationen. Die weiteren Ko-Autoren Dr. Dr. Florian Probst, Dr. Dr. Markus Tröltzscher, PD Dr. Dr. Sven Otto, PD Dr. Dr. Gerson Mast und Prof. Dr. Dr. Michael Ehrenfeld standen als Spezialisten ihres Fachs bei spezifischen Fragestellungen unterstützend zur Seite. Die Inhalte dieser Arbeit sind auch Teil der Habilitationsschrift von Dr. Dr. Matthias Tröltzscher.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war es, die Karzinogenese des Mundhöhlenkarzinoms mit der Betrachtung wichtiger Teilespekte tiefgreifender zu verstehen und Ergebnisse hervorzubringen, die sich auf die Effektivität der Therapie auswirken und diese langfristig verbessern.

Publikation A²²

In dieser Arbeit wurde ein Patientenkollektiv mit OSCC (n=50) auf die Überexpression von VEGF-R und dessen klinischer Relevanz hin untersucht. Es wurde angenommen, dass kein Zusammenhang zwischen klinischen und pathologischen Parametern und dem HPV-Status besteht. Bei der Auswertung der Präparate konnte allerdings festgestellt werden, dass die Überexpression von VEGF-R im Tumorgewebe signifikant mit der Exposition zu den allgemeinen Risikofaktoren (Nikotin- und Alkoholabusus), der Metastasierung in regionäre Lymphknoten sowie dem Tumor-assoziierten Versterben korreliert ist. Werden die VEGF-Rezeptoren im Einzelnen betrachtet, zeigt sich eine signifikante Korrelation der Überexpression von VEGF-R1 mit der Tumorgröße.²² Hingegen konnte keine Korrelation zum HPV-Status nachgewiesen werden, was bereits für das HNSCC^{144,145} mit Ausnahme des Oropharynxkarzinoms gezeigt wurde. Insgesamt zeigte sich in 88% der Präparate eine Überexpression von VEGF-R, wodurch die Autoren eine klinische Relevanz für wahrscheinlich halten. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit vorherigen Untersuchungen zu VEGF-R in HNSCC^{71,80,146,147} bzw. in OSCC.^{18,38,70}

In der Literatur wird neben der parakrinen Funktion von VEGF auch ein autokriner Mechanismus diskutiert. Dieser Signalweg soll der Apoptose von Tumorzellen entgegenwirken und das Tumorwachstum forcieren.^{39,43,70,75,80,148,149} Möglicherweise ist dies ein Grund für das schlechtere Therapieansprechen, die hohen Rezidivraten und das verkürzte Überleben von Patienten mit Tumoren, die eine VEGF-Überexpression zeigen.^{18,47-49,59,61,150,151}

Für andere Tumorentitäten ist die gezielte Hemmung von VEGF und dessen Rezeptoren bereits in der Krebstherapie zugelassen. Die Hemmung der Überexpression von VEGF und VEGF-R in OSCC stellt daher möglicherweise einen neuen Ansatzpunkt für eine Erweiterung der etablierten Therapie da.^{149,152,153} Hsu et al.⁸⁴ fordern beispielsweise, die Therapie des HNSCC immer um antiangiogenetische Antikörper gegen VEGF und VEGF-R auszuweiten, da sich dadurch die Strahlensensitivität des Tumors erhöht. Riedel et al.⁸⁵

unterstützen diese Forderung, da sie darin eine Möglichkeit sehen, die häufig auftretende Chemotherapieresistenz des HNSCC zu beheben. Beispielsweise konnten Fury et al.⁸⁶ vielversprechende Ergebnisse in der Erweiterung der Therapie von HNSCC mit Bevacizumab vorweisen, ohne dabei insgesamt die Toxizität der Therapie zu erhöhen.

Publikation B⁵

Zweck dieser Untersuchung war es, den Anteil der Patienten mit MSCC zu bestimmen, der zervikale Lymphknotenmetastasen entwickelt und mögliche klinische und pathologische Faktoren zu identifizieren, die damit assoziiert sind. 29,3% der n=92 Patienten zeigten bei Diagnosestellung LKM oder entwickelte diese im Verlauf mit einer durchschnittlichen Zeitspanne von 11,17 Monaten. Die anatomische Lokalisation des Tumors (anterior vs. posterior) und seine histologische Graduierung konnten dabei als relevante Faktoren identifiziert werden, die mit dem Auftreten von zervikalen LKM wesentlich assoziiert sind. Dabei korrelierte das Auftreten von LKM signifikant mit dem Tumor-assoziierten Versterben der Patienten.⁵ Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der aktuellen Literatur, die das Tumorverhalten des MSCC mit dem anderer Lokalisationen des OSCC vergleicht und ein einheitliches therapeutischen Vorgehen fordert.^{109,111,118-120} Beispielsweise sollte die elektive Neck-Dissection auch bei Patienten mit MSCC und klinisch unauffälligem Lymphknotenbefund durchgeführt werden, da sich dadurch deren Prognose wesentlich verbessert.^{109,111,112,114,118,119,121,122} Dieser Forderung schließen sich die Autoren dieser Publikation an, da ein MSCC ein signifikantes Risiko mit sich bringt, zervikale Lymphknotenmetastasen zu entwickeln.

Publikation C¹⁴³

Diese Arbeit ist nicht Gegenstand des vorgelegten Promotionsprojekts, wird aber aus Gründen der Vollständigkeit hier aufgeführt, da es sich inhaltlich um eine Fortentwicklung der Fragestellung handelt.

Hier wurden OSCC-Präparate im Hinblick auf die Expression von PD-L1 und PD-1+ TIL untersucht, um ggf. Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern aufzudecken. Es wurde angenommen, dass die Expression von PD-L1 und der Nachweis von PD-1+ TIL ohne klinische Relevanz sei. Dabei wurden von einer Kohorte von 88 OSCC-Patienten retrospektiv demographische, klinische und histopathologische Daten erhoben. Die OSCC-Präparate wurden immunhistochemisch auf die Expression von PD-L1 und PD-1+

TIL hin untersucht. Bei der statistischen Auswertung zeigte sich, dass in 29% der OSCC-Präparate die Expression von PD-L1 und in 83% der Präparate hohe Raten an PD-1+ TIL nachgewiesen werden konnten. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Expression von PD-L1 signifikant mit der anatomischen Herkunft des OSCC, dem Nachweis von zervikalen LKM und dem Nachweis von PD-1+ TIL korreliert.¹⁴³ Daher folgern die Autoren dieser Arbeit, dass der PD-L1 – PD-1 Signalweg auch in OSCCs eine Rolle spielt.

Auf mögliche Schwächen der wissenschaftlichen Arbeiten wird in den Originalarbeiten eingegangen.^{5,22,23}

5. SUMMARY

The main objective of this work was to further understand the carcinogenesis of OSCC by investigating it in several aspects and to produce results that impact therapy in its effectiveness and improve it in future.

Publication A²²

In this work OSCCs of a patient sample (n=50) were examined for the overexpression of VEGF-R and its clinical relevance. It was assumed that there was no correlation between clinical and pathological parameters and the HPV status. However, in the evaluation of the samples it was found, that the overexpression of VEGF-R in tumor tissue significantly correlates with the exposure to general risk factors (nicotine and alcohol abuse), metastasis in regional lymph nodes and tumor-associated death. When looking at the VEGF-receptors in detail, a significant correlation of VEGF-R1 overexpression and tumor size can be shown.²² However, no correlation could be detected with the HPV status, which has already been demonstrated for HNSCC^{144,145} with exception for the oropharyngeal carcinoma. Overall 88% of the tumor samples showed an overexpression of VEGF-R, with that the authors see a clinical relevance likely. The results are consistent with previous studies on VEGF-R in HNSCC^{71,80,146,147} and OSCC,^{18,38,70} respectively.

In addition to the paracrine function of VEGF, an autocrine mechanism is discussed in the literature. This signaling pathway is intended to counteract the apoptosis of tumor cells and to promote tumor growth.^{39,43,70,75,80,148,149} This may be one reason, why patients suffering from tumors with VEGF overexpression show poorer treatment response rates, higher recurrence rates, and a shortened survival.^{18,47-49,59,61,150,151}

In other cancer entities the targeted inhibition of VEGF and its receptors is already approved in cancer therapy. Therefor the inhibition of the overexpression of VEGF and VEGF-R in OSCC might be a new approach to extend the established therapy.^{149,152,153} For example, Hsu et al.⁸⁴ demand to expand HNSCC-therapy by antiangiogenetic antibodies against VEGF and VEGF-R, as this increases the radiation sensitivity of tumors. Riedel et al.⁸⁵ support this demand, because they think it a possibility to eliminate the often occurring chemoresistance of HNSCC. For example, Fury et al.⁸⁶ showed promising results in HNSCC-therapy by extending it with Bevacizumab without increasing the overall toxicity of the therapy.

Publication B⁵

The purpose of this study was to determine the proportion of patients with MSCC who develop cervical lymph node metastases and to identify potential associated clinical and pathological factors. 29,3% of n=92 Patients showed lymph node metastases at the time of diagnosis or developed them over time with an average time span of 11,17 months. The anatomical localization of the tumor (anterior vs. posterior) and its histological grading could be identified as relevant factors that are significantly associated with cervical lymph node metastases. The occurrence of lymph node metastasis correlated significantly with the tumor-associated mortality of patients.⁵ The results are in accordance with the current literature, that compares tumor behavior of MSCC with that of other sites of OSCC and recommend a uniform therapeutic approach.^{109,111,118-120} For example, elective neck dissection should also be performed with patients with MSCC and clinically unremarkable lymph node findings, as this significantly improves their prognosis.^{109,111,112,114,118,119,121,122} The authors share this demand, as MSCC poses a significant risk of developing cervical lymph node metastasis.

Publication C¹⁴³

This work is not part of the submitted dissertation, but for reasons of completeness it is listed here, since the content is a further development of the research question.

In this work OSCC samples were examined for the expression of PD-L1 and PD-1+ TIL, to find possible correlations with clinicopathological parameters. It was assumed, that there is no clinical relevance of PD-L1 expression and the detection of PD-1+ TIL. Retrospective demographic, clinical and histopathological data were collected from a cohort of 88 OSCC patients. The OSCC samples were immunohistochemically examined for the expression of PD-L1 and PD-1+ TIL. The statistical analysis showed, that in 29% of the OSCC samples PD-L1 and in 83% high rates of PD-1+TIL could be detected. Furthermore, the expression of PD-L1 significantly correlated with the anatomical origin of OSCC, the detection of cervical lymph node metastasis and the detection of PD-1+ TIL.¹⁴³ Therefor the authors conclude, that the PD-L1 - PD-1 signaling pathway also plays a role in OSCCs.

Possible shortcomings of the scientific work are discussed in the original papers.^{5,22,23}

6. PUBLIKATION A

Pianka A, Knösel T, Probst F, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Isoforms: Are They Present in Oral Squamous Cell Carcinoma? *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2015;73(5):897-904.

DOI: 10.1016/j.joms.2014.12.030

7. PUBLIKATION B

Troeltzsch M, Knoesel T, Woodlock T, **Pianka A**, et al. Are There Clinical or Pathological Parameters of Maxillary Oral Squamous Cell Carcinoma With an Influence on the Occurrence of Neck Node Metastasis? An Appraisal of 92 Patients. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2016;74(1):79-86.

DOI: 10.1016/j.joms.2015.07.011

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Weltgesundheitsorganisation. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. *Population Fact Sheets 2012*; http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx. Accessed 12.12.2017.
2. Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, et al. Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(19):1945-1952.
3. Chang JH, Wu CC, Yuan KSP, Wu ATH, Wu SY. Locoregionally recurrent head and neck squamous cell carcinoma: incidence, survival, prognostic factors, and treatment outcomes. *Oncotarget*. 2017;8(33):55600-55612.
4. Wang B, Zhang S, Yue K, Wang XD. The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases. *Chin J Cancer*. 2013;32(11):614-618.
5. Troeltzsch M, Knosel T, Woodlock T, et al. Are There Clinical or Pathological Parameters of Maxillary Oral Squamous Cell Carcinoma With an Influence on the Occurrence of Neck Node Metastasis? An Appraisal of 92 Patients. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2016;74(1):79-86.
6. Tankéré F, Camproux A, Barry B, Guedon C, Depondt J, Gehanno P. Prognostic Value of Lymph Node Involvement in Oral Cancers: A Study of 137 Cases. *The Laryngoscope*. 2000;110(12):2061-2065.
7. Vermorken JB, Specenier P. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol*. 2010;21(Suppl 7):252-261.
8. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J, Group M-NC. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*. 2009;92(1):4-14.
9. Goodwin WJ. Salvage Surgery for Patients with recurrent squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: When do the ends justify the means? *The Laryngoscope*. 2000;110(3 PT 2 Suppl 93):1-18.
10. Cooper J, Pajak T, Forastiere A, et al. Postoperative Concurrent Radiotherapy and Chemotherapy for High-Risk Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(19):1937-1944.
11. Feller L, Lemmer J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. *Journal of Cancer Therapy*. 2012;03(04):263-268.

12. American Cancer Society. Survival Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancer by Stage. 2016; <https://www.cancer.org/cancer/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>. Accessed 12.12.2017.
13. Cancer Research UK. Cancer mortality: Trends over time in mortality for common cancers. 2016; <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/mortality/common-cancers-compared#heading-Three>. Accessed 12.12.2017.
14. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):122-137.
15. Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2006;102(1):67-76.
16. Oliveira LR, Ribeiro-Silva A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 2011;40(3):298-307.
17. Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, et al. Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncol.* 2014;50(3):168-177.
18. Uehara M, Sano K, Ikeda H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2004;40(3):321-325.
19. Zhao SF, Yang XD, Lu MX, et al. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression in oral cancer: a meta-analysis of the literature. *Tumor Biology.* 2013;34(5):3165-3171.
20. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) DKeVDuDKD. *Mundhöhlenkarzinom Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms.* Berlin2012.
21. Troeltzsch M, Knoesel T, Eichinger C, et al. Clinicopathologic Features of Oral Squamous Cell Carcinoma: Do They Vary in Different Age Groups? *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2014.
22. Pianka A, Knösel T, Probst F, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Isoforms: Are They Present in Oral Squamous Cell Carcinoma? *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2015;73(5):897-904.
23. Troeltzsch M, Woodlock T, Pianka A, et al. Is There Evidence for the Presence and Relevance of the PD-1/PD-L1 Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma? Hints

From an Immunohistochemical Study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2017;75(5):969-977.

24. Viet CT, Dang D, Ye Y, Ono K, Campbell RR, Schmidt BL. Demethylating drugs as novel analgesics for cancer pain. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2014;20(18):4882-4893.
25. Seto T, Higashiyama M, Funai H, et al. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2006;53(1):91-96.
26. Secord AA, Darcy KM, Hutson A, et al. Co-expression of angiogenic markers and associations with prognosis in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology.* 2007;106(1):221-232.
27. Okita NT, Yamada Y, Takahari D, et al. Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2009;39(9):595-600.
28. Hirashima Y, Yamada Y, Matsubara J, et al. Impact of vascular endothelial growth factor receptor 1, 2, and 3 expression on the outcome of patients with gastric cancer. *Cancer science.* 2009;100(2):310-315.
29. Romano E, Romero P. The therapeutic promise of disrupting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint in cancer: unleashing the CD8 T cell mediated anti-tumor activity results in significant, unprecedented clinical efficacy in various solid tumors. *J Immunother Cancer.* 2015;3:15.
30. Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, Huang J. PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PloS one.* 2015;10(6):e0131403.
31. Hanahan D, Folkman D. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell.* 1996;86:353-364.
32. Folkman J. What is the Evidence that Tumors are Angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute.* 1990;82(1):4-6.
33. Williams J, Carlson G, Cohen C, Derose P, Hunter S, Jurkewicz M. Tumor Angiogenesis as a Prognostic Factor in Oral Cavity Tumors. *The American Journal of Surgery.* 1994;168:373-380.
34. Keith B, Simon MC. Tumor Angiogenesis. In:241-250.
35. Yang WH, Xu J, Mu JB, Xie J. Revision of the concept of anti-angiogenesis and its applications in tumor treatment. *Chronic Dis Transl Med.* 2017;3(1):33-40.

36. Whipple CA, Korc M. *Angiogenesis Signaling Pathways as Targets in Cancer Therapy* in *Handbook of Cell Signaling*. 2nd ed2009.
37. Michi Y, Morita I, Amagasa T, Murota S. Human oral squamous cell carcinoma cell lines promote angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor and upregulation of KDR/flk-1 expression in endothelial cells. *Oral Oncology*. 2000;36:81-88.
38. Shang ZJ, Li ZB, Li JR. VEGF is up-regulated by hypoxic stimulation and related to tumour angiogenesis and severity of disease in oral squamous cell carcinoma: in vitro and in vivo studies. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2006;35(6):533-538.
39. Ahluwalia A, Jones MK, Szabo S, Tarnawski AS. Aberrant, ectopic expression of VEGF and VEGF receptors 1 and 2 in malignant colonic epithelial cells. Implications for these cells growth via an autocrine mechanism. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;437(4):515-520.
40. Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P, Sibilia M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell*. 2010;140(2):268-279.
41. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*. 2003;9(6):669-676.
42. Pérez-Sayáns M, Suárez-Penaranda JM, Pilar GD, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, García-García A. Hypoxia-inducible factors in OSCC. *Cancer letters*. 2011;313(1):1-8.
43. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor Induces Expression of the Antiapoptotic Proteins Bcl-2 and A1 in Vascular Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(21):13313-13316.
44. Shih C-H, Ozawa S, Ando N, Ueda M, Kitajima M. Vascular Endothelial Growth Factor Expression Predicts Outcome and Lymph Node Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6:1161-1168.
45. Volm M, Koomägi R, Mattern J. Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptor Flt-1 in Squamous Cell Lung Cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1997;74:64-68.
46. Gasparini G. Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer. *The Oncologist*. 2000;5(1):37-44.
47. Shang Z, Li J, Li Z. Upregulation of serum and tissue vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis and prognosis of oral squamous cell carcinoma.

Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2007;65(1):17-21.

48. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. *Journal of clinical pathology.* 1998;51:771-775.
49. Kim SH, Cho NH, Kim K, et al. Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Journal of surgical oncology.* 2006;93(4):330-337.
50. Liu C-J, Chang K-W, Lin S-C, Cheng H-W. Presurgical serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2009;45(10):920-925.
51. Johnstone S, Logan RM. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 2007;36(3):263-266.
52. Margaritescu C, Pirici D, Stinga A, et al. VEGF expression and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical and morphometric study. *Clinical and experimental medicine.* 2010;10(4):209-214.
53. Varma S, Shameena P, Sivasankaran S, Manoj Kumar K, Varekar A. Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Oral and Maxillofacial Pathology Journal.* 2014;5(1):423-428.
54. Kapoor P, Deshmukh R. VEGF: A critical driver for angiogenesis and subsequent tumor growth: An IHC study. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP.* 2012;16(3):330-337.
55. Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S, Kojima K, Kakihara K, Yamamoto E. Immunohistochemical Study of Tumor Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncology.* 1997;33(5):369-374.
56. Kukreja I, Kapoor P, Deshmukh R, Kulkarni V. VEGF and CD 34: A correlation between tumor angiogenesis and microvessel density-an immunohistochemical study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.* 2013;17(3):367-373.
57. Naruse T, Kawasaki G, Yanamoto S, Mizuno A, Umeda M. Immunohistochemical Study of VEGF Expression in Oral Squamous Cell Carcinomas: Correlation with the mTOR-HIF-1 α Pathway. *Anticancer Research.* 2011;31:4419-4438.
58. Yanase M, Kato K, Yoshizawa K, Noguchi N, Kitahara H, Nakamura H. Prognostic value of vascular endothelial growth factors A and C in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the*

International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2014;43(7):514-520.

59. Seki S, Fujiwara M, Matsuura M, et al. Prediction of outcome of patients with oral squamous cell carcinoma using vascular invasion and the strongly positive expression of vascular endothelial growth factors. *Oral Oncology.* 2011;47(7):588-593.
60. Nayak S, Goel M, Bhatia V, et al. Molecular and phenotypic expression of decorin as modulator of angiogenesis in human potentially malignant oral lesions and oral squamous cell carcinomas. *Indian Journal of Pathology and Microbiology.* 2013;56(3):204-210.
61. Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G, Matsumura T. Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2003;39(4):391-396.
62. Faustino S, Oliveira D, Nonogaki S, Landman G, Carvalho AL, Kowalski LP. Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 2008;37(4):372-378.
63. Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K-i, Hamakawa H. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2004;40(1):13-20.
64. Tanigaki Y, Nagashima Y, Kitamura Y, Matsuda H, Mikami Y, Tsukuda M. The expression of vascular endothelial growth factor-A and -C, and receptors 1 and 3: correlation with lymph node metastasis and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med.* 2004;14(3):389-395.
65. Watanabe S, Kato M, Kotani I, Ryoke K, Hayashi K. Lymphatic Vessel Density and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Squamous Cell Carcinomas of Lip and Oral Cavity: A Clinicopathological Analysis with Immunohistochemistry Using Antibodies to D2-40, VEGF-C and VEGF-D. *Yonago Acta medica.* 2013;56:29-37.
66. Oliveira D, Faustino S, Dias dos Santos M, Nonogaki S, Landman G, Kowalski L. Lymph Node Metastases in Oral Cancer: Clinical Implication of the Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression by Malignant Cells. *Austral - Asian Journal of Cancer.* 2011;10(4):207-215.
67. Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, Udagama MN, Tilakaratne WM, Takata T. VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer. *Journal of clinical pathology.* 2008;61(1):103-108.

68. Li C, Fan J, Song X, et al. Expression of angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor receptor-3 correlates with lymphangiogenesis and angiogenesis and affects survival of oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(9):e75388.
69. Sato H, Takeda Y. VEGFR2 expression and relationship between tumor neovascularization and histologic characteristics in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Science*. 2009;51(4):551-557.
70. Stinga A, Margaritescu C, Stinga AS, et al. VEGFR1 and VEGFR2 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: a morphometric study. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2011;52(4):1269-1275.
71. Sha D, J. HY. Expression and clinical significance of VEGF and its receptors Flt-1 and KDR in nasopharyngeal carcinoma. *Ai Zheng*. 2006;25(2):229-234.
72. Ljungberg BJ, Jacobsen J, Rudolfsson SH, Lindh G, Grankvist K, Rasmuson T. Different vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-receptor 1 and -2 mRNA expression profiles between clear cell and papillary renal cell carcinoma. *BJU international*. 2006;98(3):661-667.
73. Pallares J, Rojo F, Iriarte J, Morote J, Armadans LI, de Torres I. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Histol Histopathol*. 2006;21:857-865.
74. Gray RT, O'Donnell ME, Maxwell P, McGuigan JA, Spence GM. Long-term follow-up of immunocytochemical analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF), and its two receptors, VEGF-R1 (Flt-1) and VEGF-R2 (Flk-1/KDR), in oesophagogastric cancer. *Int J Biol Markers*. 2013;28(1):63-70.
75. Peng S, Wang Y, Peng H, et al. Autocrine vascular endothelial growth factor signaling promotes cell proliferation and modulates sorafenib treatment efficacy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2014;60(4):1264-1277.
76. Talvensaari-Mattila A, Soini Y, Santala M. VEGF and its receptors (flt-1 and KDR/flk-1) as prognostic indicators in endometrial carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2005;26(2):81-87.
77. Rades D, Setter C, Dunst J, Dahl O, Schild SE, Noack F. Prognostic impact of VEGF and VEGF receptor 1 (FLT1) expression in patients irradiated for stage II/III non-small cell lung cancer (NSCLC). *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*. 2010;186(6):307-314.
78. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its two Receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in

Non-Small Cell Lung Carcinomas (NSCLCs): Correlation with Angiogenesis and Survival. *Journal of Pathology*. 1999;188:369-377.

79. Seibold ND, Schild SE, Brueghage KL, Gebhard MP, Noack F, Rades D. Prognostic impact of VEGF and FLT-1 receptor expression in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*. 2013;189(8):639-646.
80. Lalla R, Boisoneau D, Spiro J, Kreutzer D. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors on Tumor Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surgery*. 2003;129(882-888).
81. Kato H, Yoshikawa M, Miyazaki T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*. 2002;22(6C):3977-3984.
82. European Medicine Agency. *EPAR summary for the public: Avastin*. London: European Union;2017.
83. European Medicine Agency. *EPAR summary for the public: Sutent*. London: European Union;2014.
84. Hsu H, Wall N, Hsueh C, et al. Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers. *Oral Oncology*. 2014;50(1):19-26.
85. Riedel F, Götte K, Goessler U, Sadick H, Hörmann K. Targeting Chemotherapy-induced VEGF Up-regulation by VEGF Antisense Oligonucleotides in HNSCC Cell Lines. *Anticancer Research*. 2004;24(4):2179-2184.
86. Fury MG, Lee NY, Sherman E, et al. A phase 2 study of bevacizumab with cisplatin plus intensity-modulated radiation therapy for stage III/IVB head and neck squamous cell cancer. *Cancer*. 2012;118(20):5008-5014.
87. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;121(8):1813-1820.
88. Grimminger CM, Danenberg PV. Update of prognostic and predictive biomarkers in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2011;268(1):5-16.
89. Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human Papillomavirus Type 16 and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clinical Cancer Research*. 2002;8(10):3187-3192.

90. Chocolatewala N, Chaturvedi P. Role of human papilloma virus in the oral carcinogenesis: An Indian perspective. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2009;5(2):71.
91. Aderholz C, Faber A, Grobschmidt GM, et al. Small molecule-based chemotherapeutic approach in p16-positive and -negative HNSCC in vitro. *Anticancer Research*. 2013;33(12):5385-5393.
92. O'Rorke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2012;48(12):1191-1201.
93. Patil S, Rao RS, Amrutha N, Sanketh DS. Analysis of human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma using p16: An immunohistochemical study. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*. 2014;4(1):61-66.
94. Zhang ZY, Sdeek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2004;33(1):71-74.
95. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2001;91(6):622-635.
96. Sand L, Jalouli J. Viruses and oral cancer. Is there a link? *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2014;16(5):371-378.
97. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2003;104(3):336-344.
98. Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2001;125(1):1-9.
99. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*. 2014;15(12):1319-1331.
100. Castellsagué X, Alemany L, Quer M, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(6):djv403.
101. Grimm M, Iftner T, Altaki H, et al. Detection of mutation-specific epidermal growth factor receptor (E746-A750del) and lack of detection of human papillomavirus in

oral squamous cell carcinoma. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2014;43(10):1199-1205.

102. Capote A, Escorial V, Munoz-Guerra MF, Rodriguez-Campo FJ, Gamallo C, Naval L. Elective neck dissection in early-stage oral squamous cell carcinoma - does it influence recurrence and survival? *Head & neck*. 2007;29(1):3-11.
103. Kowalski LP, Sanabria A. Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. 2007;27(3):113-117.
104. Hosal AS, L. CR, Johnson JT, Myers EN. Selective Neck Dissection in the Management of the Clinically Node- Negative Neck. *The Laryngoscope*. 2000;110(12):2037-2040.
105. Wolff KD, Follmann M, Nast A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Deutsches Arzteblatt international*. 2012;109(48):829-835.
106. Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Krebshilfe e.V., AWMF. S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom: Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. *Leitlinienprogramm Onkologie*. 2012.
107. D'Cruz AK, Vaish R, Kapre N, et al. Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(6):521-529.
108. Bessell A, Glenny AM, Furness S, et al. Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: surgical treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011(9):CD006205.
109. Brown JS, Bekiroglu F, Shaw RJ, Woolgar JA, Rogers SN. Management of the neck and regional recurrence in squamous cell carcinoma of the maxillary alveolus and hard palate compared with other sites in the oral cavity. *Head & neck*. 2013;35(2):265-269.
110. Binahmed A, Nason RW, Hussain A, Abdoh AA, Sandor GK. Treatment outcomes in squamous cell carcinoma of the maxillary alveolus and palate: a population-based study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2008;105(6):750-754.
111. Yang Z, Deng R, Sun G, Huang X, Tang E. Cervical metastases from squamous cell carcinoma of hard palate and maxillary alveolus: a retrospective study of 10 years. *Head & neck*. 2014;36(7):969-975.
112. Sagheb K, Sagheb K, Taylor KJ, Al-Nawas B, Walter C. Cervical metastases of squamous cell carcinoma of the maxilla: a retrospective study of 25 years. *Clinical oral investigations*. 2014;18(4):1221-1227.

113. Montes DM, Schmidt BL. Oral maxillary squamous cell carcinoma: management of the clinically negative neck. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2008;66(4):762-766.
114. Beltramini GA, Massarelli O, Demarchi M, et al. Is neck dissection needed in squamous-cell carcinoma of the maxillary gingiva, alveolus, and hard palate? A multicentre Italian study of 65 cases and literature review. *Oral Oncology*. 2012;48(2):97-101.
115. Zhang WB, Wang Y, Mao C, Guo CB, Yu GY, Peng X. Cervical metastasis of maxillary squamous cell carcinoma. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2015;44(3):285-291.
116. Meng FY, Ko JY, Lou PJ, et al. The determining risk factors for treatment outcomes in patients with squamous cell carcinoma of the hard palate. *Annals of surgical oncology*. 2012;19(6):2003-2010.
117. Tapia JL, Goldberg LJ. The challenges of defining oral cancer: analysis of an ontological approach. *Head and neck pathology*. 2011;5(4):376-384.
118. Dalal AJ, Mc Lennan AS. Cervical metastases from maxillary squamous cell carcinoma: retrospective analysis and review of the literature. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013;51(8):702-706.
119. Simental AA, Jr., Johnson JT, Myers EN. Cervical metastasis from squamous cell carcinoma of the maxillary alveolus and hard palate. *The Laryngoscope*. 2006;116(9):1682-1684.
120. Morris LG, Patel SG, Shah JP, Ganly I. High rates of regional failure in squamous cell carcinoma of the hard palate and maxillary alveolus. *Head & neck*. 2011;33(6):824-830.
121. Zhang WB, Peng X. Cervical metastases of oral maxillary squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Head & neck*. 2016;38(Suppl 1):E2335-2342.
122. Poeschl P, R S, Czembirek C, et al. Impact of elective neck dissection on regional recurrence and survival in cN0 staged oral maxillary squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2012;48(2):173-178.
123. Brockstein BE, Stenson KM, Song S. Overview of treatment for head and neck cancer. 2017; https://www.uptodate.com/contents/overview-of-treatment-for-head-and-neck-cancer?source=see_link. Accessed 13.12.2017.
124. Gibson MK, Li Y, Murphy B, et al. Randomized phase III evaluation of cisplatin plus fluorouracil versus cisplatin plus paclitaxel in advanced head and neck cancer (E1395): an intergroup trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of*

clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005;23(15):3562-3567.

125. Jacobs C, Lyman G, Velez-Garcia E, et al. A Phase III Randomized Study Comparing Cisplatin and Fluorouracil as Single Agents and in Combination for Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Journal of Clinical Oncology.* 1992;10(2):257-263.
126. Vermorken JB, Peyrade F, Krauss J, et al. Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). *Ann Oncol.* 2014;25(3):682-688.
127. Ghi MG, Paccagnella A, Ferrari D, et al. Induction TPF followed by concomitant treatment versus concomitant treatment alone in locally advanced head and neck cancer. A phase II-III trial. *Ann Oncol.* 2017;28(9):2206-2212.
128. Dietz A. *Nivolumab neues Anwendungsgebiet, Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs - Stellungnahme.* Berlin: Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V.;2017. 2017-06-01-D-29.
129. Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1856-1867.
130. Seiwert TY, Burtness B, Mehra R, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *The Lancet Oncology.* 2016;17(7):956-965.
131. Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;23:32-38.
132. Lin J, Lai J, Biel MA, Xu Y, Chen L. Immunosuppressive Microenvironment in Head and Neck Cancer. *Contemporary Issues in Head and Neck Cancer Management.* 2015.
133. Malm IJ, Bruno TC, Fu J, et al. Expression profile and in vitro blockade of programmed death-1 in human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck.* 2015;37(8):1088-1095.
134. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med.* 2015;21(1):24-33.
135. Zandberg DP, Strome SE. The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2014;50(7):627-632.
136. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol.* 2007;19(7):813-824.

137. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
138. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) DKeVDuDKD. Therapie und Nachsorge des Melanoms
Langversion 3.1. 2018.
139. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) DKeVDuDKD. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0. 2018.
140. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) DKeVDuDKD. Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms
Langversion 1.2. 2017.
141. Wit de M, Bauernhofer T, Bokemeyer C, et al. Leitlinie Blasenkarzinom - Onkopedia. 2017; <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/blasenkarzinom-urothelkarzinom/@@view/html/index.html>. Accessed 04.10.2018, 2018.
142. Harrington KJ, Ferris RL, Blumenschein G, et al. Nivolumab versus standard, single-agent therapy of investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (CheckMate 141): health-related quality-of-life results from a randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(8):1104-1115.
143. Troeltzsch M, Woodlock T, Pianka A, et al. Is There Evidence for the Presence and Relevance of the PD-1/PD-L1 Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma? Hints From an Immunohistochemical Study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2017;75(5):969-977.
144. Liu K, Ma L, Wang D, Wu F, Wang R. Relationship between HPV infection and expression of HIF-1alpha and VEGF in head and neck squamous cell carcinoma and its prognostic value. *Journal of Shanghai Jiaotong University*. 2013;33(6):806.
145. Troy JD, Weissfeld JL, Youk AO, Thomas S, Wang L, Grandis JR. Expression of EGFR, VEGF, and NOTCH1 suggest differences in tumor angiogenesis in HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Head and neck pathology*. 2013;7(4):344-355.
146. Herold-Mende C, Andl T, Laemmle F, Reißer C, Mueller M. Funktionelle Expression des VEGF-Rezeptors Flt-1 auf Plattenepithelkarzinomzellen. *HNO*. 1999;47(8):706-711.

147. Denhart B, Guidi A, Tognazzi K, Dvorak H, Brown L. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in oral and laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. *Laboratory Investigation*. 1997;77(6):659-664.
148. Decio A, Taraboletti G, Patton V, et al. Vascular endothelial growth factor c promotes ovarian carcinoma progression through paracrine and autocrine mechanisms. *The American journal of pathology*. 2014;184(4):1050-1061.
149. Matsuura M, Onimaru M, Yonemitsu Y, et al. Autocrine loop between vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 positively regulates tumor-associated lymphangiogenesis in oral squamoid cancer cells. *The American journal of pathology*. 2009;175(4):1709-1721.
150. Smith B, Smith G, Carter D, Sasaki C, Haffty B. Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor Protein Levels in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18(10):2046-2052.
151. Tse GM, Chan AW, Yu KH, et al. Strong immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor predicts overall survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of surgical oncology*. 2007;14(12):3558-3565.
152. Aggarwal S, Devaraja K, Sharma SC, Das SN. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2014;436:35-40.
153. Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A, et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head & neck*. 2003;25(6):464-474.

9. DANKSAGUNG

Hiermit bedanke ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Dr. Michael Ehrenfeld, mir die Gelegenheit zu geben, dieses Thema an seiner Klinik im Rahmen einer medizinischen Promotion zu bearbeiten und bei PD Dr. Dr. Sven Otto, mir die Möglichkeit zu geben, diese Arbeit unter seiner Leitung durchführen zu können, sowie für die freundliche Unterstützung für den gesamten Zeitraum.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Matthias Tröltzscher für die hervorragende Betreuung bei dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich ihm für seine beständige Hilfsbereitschaft, seine kontinuierliche Unterstützung vom ersten Tag an und vor allem für seinen außerordentlichen wissenschaftlichen Beistand danken.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Knösel und seinem Team sehr für die beständige Unterstützung bei der histologischen Auswertung und Bearbeitung der pathologischen Präparate danken.

Weiterhin möchte ich den Co-Autoren der Publikationen für deren großzügige Hilfestellung bei wissenschaftlichen Fragestellungen und deren Unterstützung bei der Anfertigung sehr herzlich danken.