

Aus der Abteilung für Strahlenzytogenetik

Leiter Prof. Dr. rer. nat. Horst Zitzelsberger

Helmholtz Zentrum München

**Vergleich von Auswertemethoden einer immunhistochemischen PD-L1-Färbung anhand eines Kopf-Hals-Tumor-Kollektivs:
Bedeutung für Therapieresistenz und Rezidiventstehung**

Dissertation

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



vorgelegt von

Jan-Niklas Rasim

aus Recklinghausen

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Horst Zitzelsberger

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Christoph Walz

Dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Christoph Reichel

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2023

Eidesstattliche Versicherung

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

Vergleich von Auswertemethoden einer immunhistochemischen PD-L1-Färbung anhand
eines Kopf-Hals-Tumor-Kollektivs:
Bedeutung für Therapieresistenz und Rezidiventstehung

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 an gleicher oder
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde

Neuried, 17.10. 2022

Ort, Datum

Jan-Niklas Rasim

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Tumore der Kopf-Hals-Region	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2	Pathologie und Diagnostik	2
1.1.3	Genetische Charakteristika von HNSCC	4
1.1.4	Bedeutung des Tumormikromilieus in HNSCC	5
1.1.5	Bedeutung von PD-1/PD-L1 in HNSCC	6
1.1.6	Therapiemodalitäten bei HNSCC	6
1.1.7	Neue Therapieansätze bei HNSCC	8
1.1.8	Zielsetzung	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Patientenkollektive	11
2.2	Immunhistochemische Färbungen	19
2.2.1	Durchführung der PD-L1-Färbung	19
2.2.2	Immunphänotypen	20
2.2.3	Bestimmung des HPV-Status	22
2.3	Scores zur PD-L1-Testung	23
2.4	Statistische Methoden	25
3	Ergebnisse	28
3.1	Immunhistochemische Färbungen zur Bestimmung der PD-L1-Expression und von Immunphänotypen	28
3.2	Die PD-L1-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status bei HNSCC	32
3.3	Die prognostische Bedeutung der PD-L1-Expression in HNSCC nach adjuvanter Radiochemotherapie	33
3.4	Heterogenität der PD-L1-Expression in HNSCC	36
3.5	Zusammenhang Rezidivbildung und PD-L1-Expression in HNSCC	40
4	Diskussion	42
4.1	Methodische Limitationen bei der immunhistochemischen PD-L1-Färbung und Auswertung	42
4.1.1	Immunhistochemische PD-L1-Färbung	42
4.1.2	Auswerte-Scores für die immunhistochemische PD-L1-Färbung	43
4.2	Zusammenhang PD-L1-Expression und Immunzellinfiltration	45
4.3	Der Einfluss des HPV-Status auf PD-L1-Expression und Immunphänotyp	46
4.4	Prognostischer Wert der PD-L1-Expression in HPV-negativen HNSCC nach adjuvanter Radiochemotherapie	47
4.4.1	PD-L1-Expression als prädiktiver Biomarker für die Immun-Checkpoint-Inhibition	47
4.4.2	PD-L1-Expression als prognostischer Marker nach adjuvanter Radiochemotherapie	48
4.4.3	Korrelation der PD-L1-Expression mit anderen klinischen Parametern	50
4.5	Heterogenität der PD-L1-Expression in HNSCC	51

4.6	PD-L1-Expression in HNSCC bei Primärtumoren und Rezidiven	53
5	Summary	55
6	Zusammenfassung	57
7	Anhang.....	59
8	Literaturverzeichnis	82
9	Danksagung.....	98
10	Lebenslauf	99

Liste der Abbildungen

Abbildung 1: Herstellung eines TMA.....	18
Abbildung 2: Darstellung der multivariablen Cox-Regression.....	26
Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung von PD-L1 (Antikörper SP263) und CD3/CD8 positiven Immunzellen (Antikörper SP7 und C8-144B).....	29
Abbildung 4: Streudiagramm für alle gemessenen Tumor-Proben.....	31
Abbildung 5: PD-L1-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status in den untersuchten HNSCC Tumorkollektiven.	32
Abbildung 6: Prognostischer Wert der PD-L1-Expression in den HNSCC Tumor- kollektiven	34
Abbildung 7: Prognostische Analyse mittels „Risk-Score“	35
Abbildung 8: Heterogenität der PD-L1-Expression in den HNSCC Tumorkollektiven...	39
Abbildung 9: Änderung der PD-L1-Expression zwischen Primär-und Rezidiv-Tumor...	41

Liste der Tabellen

Tabelle 1: Summarische Tabelle der drei Kollektive	14
Tabelle 2: Validierungstabelle zur Heterogenität	37
Tabelle 3: Klinische Daten der Kollektive.....	60
Tabelle 4: Scoring-Ergebnisse der Kollektive	71

Abkürzungsverzeichnis:

CAF	Cancer associated Fibroblast
CD3	Cluster of Differentiation 3
CD8	Cluster of Differentiation 8
CPS	Combined Positivity Score
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte associated Protein 4
ECE	Extracapsular Extension (extrakapsuläres Wachstum)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FFPE	Formalin-fixed, Paraffin-embedded (Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet)
Gy	Gray (Maß für die Strahlenbelastung)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region)
HPV	Humanes Papillomavirus
ICH	Immunhistochemie
IL	Interleukin
LMU-KKG	Klinische Kooperationsgruppe der LMU München
LVI	Lymphgefäßinfiltration
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDSC	Myeloid derived Suppressor Cells
MIC	Mononuclear inflammatory cell (Mononukleäre inflammatorische Zelle)
MMP	Matrix-Metalloprotease
NSCLC	Non-small-cell Lung Cancer (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
OS	Overall-Survival (Gesamtüberleben)
PD-1	Programmed Death Protein 1
PD-L1/2	Programmed Death Ligand 1/2
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PFS	Progressionsfreies Überleben
Pn	Perineuralscheideninfiltration
RF	Recurrence Free (Rezidivfreiheit)
TGF	Transforming Growth Factor β
TMA	Tissue-Micro-Array
TME	Tumor Microenvironment (Tumormikromilieu)
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNM	Tumorklassifikation (T= Tumor, N= Nodus, M= Metastase)
TPS	Tumor Proportion Score
UICC	Union internacional contre cancer
VEGF	Vascular endothelial Growth Factor
VTI	Venöse Tumorinfiltration

1 Einführung

1.1 Tumore der Kopf-Hals-Region

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Malignome des Kopf-Hals-Bereichs bilden weltweit die sechsthäufigste Tumorentität. Plattenepithelkarzinome (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) repräsentieren dabei mit circa 890.000 Fällen jährlich die am häufigsten auftretende Subgruppe (Ferlay, 2020). Es zeigt sich seit den 90er-Jahren ein zunehmender Anstieg der altersstandardisierten Erkrankungsraten, wobei es vor allem zu einer Zunahme von Tumoren der Mundhöhle und des Oropharynx gekommen ist (Wienecke, 2019; Dietz, 2018). Davon ausgehend wird bis zum Jahr 2030 mit einem weiteren Anstieg der weltweiten HNSCC-Inzidenz von bis zu 30 % gerechnet (Bray, 2018). Aufgrund der unterschiedlichen, geschlechtsspezifischen Risikofaktoren erkranken in Deutschland Männer circa viermal häufiger an HNSCC (RKI, 2017) und weisen dabei eine höhere Mortalität und schlechtere 5-Jahres Überlebensrate auf. Geografisch betrachtet zeigt sich ein deutliches innereuropäisches Gefälle: Menschen in osteuropäischen Ländern erkranken dreimal so häufig an Kopf-Hals-Malignomen wie Menschen in nordeuropäischen Ländern. Die Bundesrepublik Deutschland weist dabei im europäischen Vergleich überdurchschnittliche Überlebensraten auf (Wienecke, 2019). Das verbesserte Gesamtüberleben ist vor allem auf das erhöhte Auftreten von HPV-induzierten Karzinomen und auf neuere multimodale Therapieformen zurückzuführen (Johnson, 2020).

Ätiologisch unterscheidet man zwischen HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC, welche sich tumorbiologisch grundlegend voneinander unterscheiden (Kobayashi, 2018).

Die HPV-negativen HNSCC sind die klassischen, durch Noxen ausgelösten Malignome, welche in den allermeisten Fällen durch starkes Rauchen oder chronischen Alkoholkonsum verursacht werden. Rauchen und Nikotinkonsum zusammen haben dabei eine stark potenzierende Wirkung (Blot, 1988; Talamini, 2002). Beim Rauchen sind die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, beim chronischen Alkoholkonsum hingegen der Acetaldehyd (Johnson, 2020) für die Verursachung irreparabler DNA-Schäden und somit für die Kanzerogenität ursächlich (Hecht, 1999). Im Gegensatz dazu entstehen die HPV-positiven Karzinome durch eine persistierende oropharyngeale Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV), welche vor allem durch Haut-/Schleimhautkontakt und hier vor allem beim ungeschützten Sexualverkehr übertragen werden (Gillison, 2015). Die Übertragung des Erregers wird dabei durch Mikrotraumata von Haut und Schleimhäuten begünstigt.

Die beiden HNSCC-Subgruppen unterscheiden sich auch hinsichtlich des mittleren Erkrankungsalters, welches für HPV-negative Tumorpatienten bei 66 Jahren, für HPV-positive Patienten hingegen bei 53 Jahren liegt (Johnson, 2020). Bei HPV-positiven Karzinomen tragen vor allem humane Papillomaviren der Hochrisiko-Typen 16 und 18 zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region bei (Michaud, 2014). 90% aller HPV-positiven HNSCC werden dabei durch den Typ 16 hervorgerufen (Kobayashi, 2018) und sind vor allem im Bereich des Oropharynx vorzufinden, wo sie circa 70% der Karzinome verursachen, (Stein, 2015). Dabei bilden HPV-positive Karzinome sowohl prognostisch als auch pathophysiologisch eine eigene Tumorentität.

Das HPV-Genom umfasst sieben „Early Genes“ (E1-E7) und zwei „Late Genes“ (L1, L2). L1 und L2 kodieren für virale Capsid-Proteine, E1-E7 hingegen für Proteine, welche für die Replikation und Transkription des viralen Genoms essenziell sind. Die onkogene Transformation geht vor allem von den Genen E6 und E7 aus (Moody, 2010). In der menschlichen Wirtszelle

in der Mukosa bildet das E6-Gen mit dem Tumorsuppressor-Gen p53 einen Komplex aus und inhibiert damit p53 (Tomaić, 2016). Durch die Überwindung des „Check Points“ von G₀ zur S-Phase nehmen dann auch DNA-Schäden und Chromosomenaberrationen zu. Das E7-Gen hingegen bindet an das Retinoblastom-assoziierte Protein (RB1) (Moody, 2010) und führt so zur Freisetzung von E2F1-Transkriptionsfaktoren. Die Folge ist ein vorzeitiger Übergang in die S-Phase des Zellzyklus und die Expression von E2F1-regulierten Genen in der S-Phase. Durch diese Mechanismen wird die DNA-Reparatur beeinflusst, die Transformation der Wirtszelle eingeleitet und das Gen p16^{INK4a} stark exprimiert, welches einen Surrogat-Marker für ein HPV-positives Karzinom darstellt. Die Expression der viralen Gene E6 und E7 führt somit bei HPV-positiven Tumoren zu einer unkontrollierten Proliferation der Keratinozyten und zur Transformation dieser Zellen. Neben den oben genannten Ursachen gibt es weitere Risikofaktoren für die Entstehung von HNSCC. Bei den Mundhöhlenkarzinomen ist das in einigen Ländern verbreitete Kauen von Betelnüssen/-blättern ein wichtiger Risikofaktor (Narayanan, 2020), sowie die Fanconi-Anämie; eine genetische Erkrankung, bei welcher es zu Defekten multipler DNA-Reparaturgene kommt (Schethenbach, 2012). Zunehmendes Alter, Feinstaubbelastung, Luftverschmutzung, sowie eine chronisch mangelhafte Mundhygiene können zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle beitragen (Banerjee, 2017).

1.1.2 Pathologie und Diagnostik

Patienten mit HNSCC klagen, je nach Lokalisation und Ausdehnung des Primärtumors, über eine variable Beschwerdesymptomatik (Markman, 2021). Während sich Larynxkarzinome oftmals frühzeitig durch eine Dysphonie bemerkbar machen (Leeman, 2020), werden Tumore anderer Lokalisation (beispielsweise Oropharynx, Hypopharynx) oft erst in fortgeschrittenen Stadien durch eine Dysphagie oder Schmerzsymptomatik mit erschwerter Nahrungsaufnahme diagnostiziert (Bradley, 2019). Mit fortschreitender Tumorerkrankung kommt es zu transkutan-perforierenden Tumoren oder Lymphknotenmetastasen. Tumorarrosionsblutungen durch Infiltration größerer Gefäße oder eine respiratorische Erschöpfung bei einem die Atemwege obstruierenden Karzinom, sind weitere Symptome von fortgeschrittenen Tumorstadien. Je nach Tumorlokalisierung können auch Hirnnervenausfälle, eine Kieferklemme oder Doppelbilder auftreten (Hafner, 2014).

Bei der Karzinogenese kommt es zunächst zur Entstehung einer Hyperplasie und anschließender Ausbildung einer Dysplasie (Einteilung in leicht, moderat, schwer) des Oberflächenepithels. Mit andauernder Noxenexposition geht die Dysplasie in ein Carcinoma in situ (Basalmembran intakt) und letztlich in ein invasives Karzinom über, welches durch einen infiltrativen Tumordurchbruch der Basalmembran definiert ist (Johnson, 2020).

Für die apparative Diagnostik von Kopf-Hals-Malignomen kommt der Sonografie, Computertomografie, Kernspintomografie und dem PET-CT eine zentrale Bedeutung zur Ausdehnungsbestimmung des Tumors, sowie Detektion etwaiger regionaler oder distanter Metastasen zu (Hafner, 2014).

Darüber hinaus ist die histopathologische Bestätigung und Klassifizierung der Tumore von entscheidender Bedeutung. Hierfür ist eine Biopsie des Tumors und anschließende histopathologische Aufarbeitung essenziell (Pynnönen, 2017). Für die Diagnosestellung wird eine Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung der Tumorschnitte durchgeführt. Auf dieser Grundlage wird der Tumor nach internationalen, standardisierten Kriterien klassifiziert, um die weitere Therapie bestmöglich planen zu können (Wittekind, 2006). Dabei ist das TNM-Stadium zusammen mit dem HPV-Status der prognostisch relevanteste Faktor bei HNSCC.

Die TNM-Klassifikation bildet dabei Konsens-Kriterien des „American Joint Committee on Cancer (AJCC)“ und der „Union for International Cancer Control (UICC)“ ab und beschreibt dabei eine klinische, radiologische und pathologische Einordnung der Tumorerkrankung.

Das T-Stadium (Tumor) bezeichnet die Größe des Primärtumors (T1= <2cm, T2= 2-4cm, T3> 4cm, T4= Infiltration von Nachbarstrukturen). Unter dem N-Stadium (Nodus) wird der regionale Lymphknotenstatus (Anzahl befallener Lymphknoten) beschrieben (N0-N3). Der M-Status gibt Auskunft über vorhandene Fernmetastasen (M0-M1). Beispielsweise versteht man unter einem Tumor mit dem Stadium cT1 cN0 cM0 einen Tumor kleiner als zwei Zentimeter ohne Befall regionärer Lymphknoten und ohne distante Metastasen. Das Präfix „c“ wird für die klinische, radiologische oder bioptische Einteilung verwendet, wohingegen im postoperativen Stadium das Präfix „p“ verwendet wird. Aus dem personalisierten TNM-Stadium lassen sich gemäß den Vorgaben des UICC die Tumorstadien I-IV ableiten (Glastonbury, 2020). Mit zunehmendem Tumorstadium verschlechtert sich die Prognose des Krankheitsverlaufs.

Wegen ihrer unterschiedlichen Tumorbiologie und der damit verbundenen besseren Prognose wurden HPV-positive Oropharynxkarzinome als eigene Tumorentität definiert (O'Sullivan, 2016). Grundlage hierfür war ein deutlich unterschiedliches, UICC-Stadien-abhängiges, 5-Jahres-Gesamtüberleben zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Karzinomen (HPV-negativ: I= 76%, II= 68%, III=53%, IVa=53%, IVb=34%; HPV-positiv: I=88%, II=82%, III=84%, IVa=81%) (O'Sullivan, 2016). Bei HPV-positiven Tumoren fällt erst im Stadium IVb das 5-Jahres Gesamtüberleben auf 60% ab. Diese Erkenntnisse fanden auch Eingang in die 8. Auflage der internationalen UICC/TNM-Klassifikation. Wurde beispielsweise in der 7. Auflage der TNM-Klassifikation ein HPV-positives T1N2bM0-Oropharynxkarzinom noch dem Stadium IVa zugeordnet, so entspricht dies in der aktuellen 8. Auflage einem Stadium I-Tumor. Durch diese Änderung werden jetzt bis zu 80% aller HPV-positiven Oropharynxkarzinome dem UICC Stadium I zugeordnet und weisen eine durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von 90% auf (Glastonbury, 2020). Darüber hinaus wurden im neuen Klassifizierungsschema auch für HPV-negative Karzinome die Infiltrationstiefe von Mundhöhlenkarzinomen berücksichtigt und der N-Status durch den Faktor des extrakapsulären Wachstums erweitert (Amin, 2017).

Bei der histopathologischen Klassifizierung von HNSCC werden noch weitere, ergänzende Kriterien herangezogen: der Differenzierungsgrad (G), der Tumoreinbruch in Blutgefäße (V), die Perineuralscheideninfiltration (Pn), sowie ein Kapseldurchbruch des Tumors in einem oder mehreren Lymphknoten (ECE). Häufig zeigen HPV-positive Tumoren eine bessere Differenzierung als HPV-negative HNSCC auf (Westra, 2009). Darin spiegelt sich auch wider, dass die Aggressivität eines Tumors mit geringerem Differenzierungsgrad steigt (Wittekind, 2006). Ein besonders ungünstiger Faktor für die Prognosebeurteilung ist das extrakapsuläre Wachstum, da die Kapsel eines Lymphknotens eine natürliche Barriere bei der Tumorprogression darstellt (Ferlito, 2002). Deshalb ist bei Vorliegen eines extrakapsulären Wachstums das Risiko für lokoregionäre Rezidive und hämatogene Fernmetastasen deutlich erhöht (Myers, 2001). Dies hat zur Folge, dass bei Vorliegen eines extrakapsulären Wachstums in der Regel die Indikation für eine adjuvante Strahlen(chemo)therapie vorliegt. Auch die prognostische Relevanz des extrakapsulären Wachstums spiegelt sich in der aktuellen 8. Auflage der UICC-TNM-Klassifikation bei den HPV-negativen Karzinomen wider.

Zusätzlich zu den oben genannten Kriterien erfolgt nach Tumorresektion die Festlegung des Resektionsstatus (R0= kein Resttumor, R1= mikroskopisches Residuum, R2= makroskopisches Residuum). Ist eine Tumorresektion mit einem Sicherheitsabstand kleiner als 5mm durchgeführt worden, so wird dies als „Close Margin“ Resektion bezeichnet. Diese Art der Resektion geht mit einem schlechteren klinischen Verlauf und erhöhtem Auftreten von lokoregionären Rezidiven einher, weshalb auch hier eine adjuvante Strahlentherapie angezeigt ist.

Neben den oben dargestellten histopathologischen Kriterien spielen zunehmend genetische Biomarker eine Rolle, um die individuelle Prognose des Krankheitsverlaufs abzuschätzen und Patienten für spezifische Therapiekonzepte zu stratifizieren.

1.1.3 Genetische Charakteristika von HNSCC

Um Prognose, Gesamtüberleben und Therapieansprechen von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region abzuschätzen, ist es essenziell, molekulare Biomarker nachzuweisen. Dabei ist es von besonderer Bedeutung, dass die Pathogenese von HNSCC durch genetische Instabilität und einer hohen Zahl an chromosomalen Aberrationen gekennzeichnet ist (Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas, 2015). Eine wichtige chromosomale Bande ist hierbei 9p21, da hier das Tumorsuppressorgen CDKN2A und das Gen ARF lokalisiert sind. CDKN2A kodiert für CDK4 und den CDK6-Inhibitor p16^{INK4a}, wohingegen ARF für p14 kodiert, welches die Funktion hat, das Tumorsuppressorgen p53 zu stabilisieren. Bei der Entstehung HPV-negativer HNSCC sind maßgeblich Mutationen und der Verlust der Tumorsuppressorgene CDKN2A (in 22% der Tumoren) und TP53 (in 72% der Tumoren) beteiligt (Johnson, 2020). Häufig sind bei HPV-negativen HNSCC auch Rezeptor-Tyrosinkinasen amplifiziert (vor allem EGFR und HER2). Eine Überexpression von EGFR tritt in 80-90% aller HPV-negativen HNSCC auf und ist verbunden mit einem schlechteren Gesamtüberleben (Grandis, 1998). Im Gegensatz dazu sind HPV-positive Karzinome unter anderem durch einen Verlust von TRAF3 und einer Amplifikation von E2F1 charakterisiert.

Auf molekularer Ebene finden bei der Entstehung von HNSCC multiple genetische Veränderungen statt, die eine Deregulation zahlreicher molekularer Signalwege zur Folge, sowie Einfluss auf die PD-L1-Expression oder die Regulation des Immunsystems haben.

Der Phosphoinositid-3-Kinase/Protein-Kinase B-Signalweg ist einer der am häufigsten veränderten Signalwege bei HNSCC (Wang, 2017), der unter anderem die PD-L1-Expression reguliert. Dabei treten Mutationen oder Amplifikationen von PI3K oder ein Verlust von PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) auf (Squarize, 2013). Dieser Signalweg ist essenziell für die Zellproliferation, zusätzlich beeinflusst mTOR auch die Regulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems (O'Donnell, 2018). Es kommt durch eine verringerte Expression von negativen Regulatoren wie PTEN zu einer Aktivierung von PI3K/AKT und schließlich zu einer verstärkten PD-L1-Expression (Chen, 2016). Darüber hinaus ist auch der MAPK-Signalweg (Mitogen activated Protein Kinase) häufig in HNSCC verändert. Er dient zur Übertragung eines extrazellulären Signals in eine intrazelluläre Antwort bei zellulären Prozessen wie der Zellproliferation und Differenzierung. Damit beeinflusst er auch maßgeblich Metastasierung und Tumordinvasion (Peng, 2018). Einen wichtigen Einfluss auf das Immunsystem und die Expression von PD-L1 hat auch der JAK/STAT3-Signalweg, dessen Aktivierung über die Januskinase erfolgt. Dadurch wird die Expression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Interferonen reguliert, sowie die Expression von PD-L1 beeinflusst (Banerjee, 2017). Eine Überexpression des STAT-3-Signalweges ist aufgrund erhöhter Tumordinvasion und Metastasierungstendenz mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. Eine Deregulation des WNT-β-Catenin-Signalwegs stört die Tumorüberwachung durch das Immunsystem und führt zum sog. „Immune Escape“, was zu einer Therapieresistenz bei diversen Formen der Immuntherapie, unter anderem der Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren führen kann (Galluzzi, 2019). Darüber hinaus ist dieser Signalweg mit maligner Transformation, Tumorprogression und Therapieresistenz gegenüber konventionellen Therapien assoziiert (Harb, 2019). Die Expression von PD-L1 kann auch durch Toll-like-Rezeptoren (TLR) oder Interferon-getriebene nukleäre Faktoren (NF-κB) gefördert werden. Der NF-κB Signalweg ist einer der wichtigsten Mediatoren bei der Interferon-induzierten PD-L1-Expression (Antonangeli, 2020).

Zudem kann auch eine Inhibition des Hedgehog-Signalweges die antitumorale Aktivität der Lymphozyten fördern (Onishi, 2016).

1.1.4 Bedeutung des Tumormikromilieus in HNSCC

Das Mikromilieu der HNSCC („Tumor Microenvironment“; TME) ist ein Netz von Stromazellen, welches vornehmlich von Endothelzellen, Immunzellen und tumorassoziierten Fibroblasten („Cancer associated Fibroblasts“, CAF) gebildet wird und eine wichtige Bedeutung bei der Metastasierung, Rezidivbildung und Tumordinvasion hat. Tumor- und Stromazellen stehen hier in einer engen Wechselwirkung über Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Oberflächenrezeptoren wie CD44 (Sterz, 2010). CAF-Zellen kommt hierbei eine besondere Rolle zu, weil sie zusammen mit den Tumorzellen zahlreiche Wachstumsfaktoren (wie zum Beispiel EGFR, VEGF), Zytokine (vor allem IL-6) und Chemokine produzieren. Diese regen das Tumorstadium, die Angiogenese, und Rekrutierung von immunsuppressiven Zellen an. Dadurch ist auch eine ausreichende Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sichergestellt (Peltanova, 2019). Sauerstoff ist ein wichtiger Faktor im Tumormikromilieu, da er die Therapieeffizienz und damit die Prognose maßgeblich beeinflusst. Eine niedrige Sauerstoffkonzentration innerhalb der Tumorzellen ist mit einer schlechteren Prognose und einer erhöhten Resistenz gegenüber einer Radiotherapie verbunden (Gottgens, 2019) Die Hypoxie fördert die Freisetzung von HIF1 α , welches wiederum indirekt die Expression von VEGF und somit das Tumorstadium verstärkt. Eine Gewebshypoxie im Tumormikromilieu fördert außerdem die Ausbildung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) (Brizel, 1999). Die EMT beschreibt den Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp eines Tumors. Dies spielt eine zentrale Bedeutung bei der Metastasierung von HNSCC, da die Zellen, welche eine Transition durchlaufen haben, eine Herunterregulierung von E-Cadherin, sowie eine Hochregulation von Vimentin aufweisen. Die Folge ist eine erhöhte Invasion und Migration von Tumorzellen, was das Metastasierungsrisiko erhöht. (Nijkamp, 2011).

HNSCC besitzen verschiedene Mechanismen, um dem Immunsystem zu entgehen. Durch Wachstumsfaktoren und Zytokine des Tumormikromilieus, vor allem VEGF, TGF β und IL-6/10, werden tumorsuppressive Faktoren (T-Effektorzellen, NK-Zellen) gehemmt und immunsuppressive Faktoren (regulatorische T-Zellen, MDSC, M2, Makrophagen) stimuliert (Canning, 2019).

Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor bei HNSCC sind die Immunzellen (Partlova, 2015) und hier insbesondere die tumorinfiltrierenden Lymphozyten (sogenannte TILS) im Tumormikromilieu. Hohe Konzentrationen an TILS im Tumorgebiet korrelieren zumeist mit einem günstigeren Krankheitsverlauf. Hierbei kommt dem Verhältnis von tumorsuppressiver Komponente (T-Effektorzellen und natürlichen Killerzellen) zu immunsuppressiver Komponente (regulatorischen T-Zellen und M2-Makrophagen) eine wichtige Bedeutung zu (Fang, 2017). Ein Überwiegen der immunsuppressiven Komponente in Form von regulatorischen T-Zellen, M2-Makrophagen und „Myeloid derived Suppressor Cells“ (MDSC) ist tendenziell mit einer schlechteren Prognose verbunden (Peltanova, 2019). HPV-positive Karzinome weisen im Vergleich zu HPV-negativen Karzinomen eine höhere Konzentration an TILS im Bereich des Tumors und somit meist eine bessere Prognose auf (Ward, 2014). Die Immunzellinfiltration im Tumormikromilieu hat eine wichtige Verbindung zur Expression von PD-L1 und CTLA4 in den Tumorzellen von HNSCC. Einerseits kann dadurch die Aktivität zytotoxischer T-Zellen erhöht werden, andererseits kann die Wechselwirkung zwischen PD-L1 auf der Oberfläche von Tumorzellen und PD-1 auf der Oberfläche von T-Zellen blockiert und damit therapeutisch genutzt werden, indem die durch die PD-L1/PD-1 Wechselwirkung hervorgerufene, verminderte Aktivität des Immunsystems wieder aufgehoben wird. In ähnlicher Weise ist die CTLA4-

Expression auf der Oberfläche von T-Zellen, die die Aktivität des Immunsystems hemmt, ein therapeutischer Ansatzpunkt, um die antitumorale Antwort des Immunsystems zu steigern. Im Nachfolgenden wird insbesondere auf die Bedeutung von PD-L1 in HNSCC eingegangen, da es einen zentralen Fokus der vorliegenden Arbeit darstellt.

1.1.5 Bedeutung von PD-1/PD-L1 in HNSCC

Der PD-1/PD-L1- Signalweg induziert und kontrolliert die Immuntoleranz innerhalb des Tumormikromilieus (Dai, 2014). Die PD-1/PD-L1-Wechselwirkung zwischen Immun- und Tumorzelle hemmt die T-Zell-Aktivierung, -Proliferation und zytotoxische Sekretion innerhalb des Tumors. Die Folge ist eine verminderte Immunreaktion gegen den Tumor.

PD-1 („Programmed Cell Death Protein 1“) ist ein Typ I-Transmembran-Glykoprotein aus der CD28-Familie und wird von dem PDCD1-Gen kodiert. PD-1 besteht aus 288 Aminosäuren. Das Protein ist unterteilt in eine extrazelluläre N-Domäne (IgV-Domäne), eine hydrophobe, Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Strukturdomäne. Die zytoplasmatische Strukturdomäne besteht aus einem Immun-Rezeptor Tyrosin-basierten inhibitorischen Motiv (ITIM) und einem Immun-Rezeptor Tyrosin-basierten Switch-Motiv (ITSM) (Chemnitz, 2004). PD-1 sitzt auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen, regulatorischen T-Zellen (Tregs, CD4+, FOXP3+), aktivierten B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und Monozyten (Okazaki, 2007). PD-1 ist stark exprimiert auf der Oberfläche von Tumor-spezifischen T-Zellen (Ahmadzadeh, 2009).

PD-L1 („Programmed Death Ligand 1“) und PD-L2 („Programmed Death Ligand 2“) sind Liganden von PD-1 und gehören als Typ I-Glykoproteine zu der Protein B7-Familie (Latchman, 2001). PD-L1 wird vor allem von Antigen-präsentierenden Zellen (APC= dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten), jedoch auch von Nicht-Immunzellen exprimiert. Von besonderer Bedeutung ist, dass PD-L1 auch von Tumorzellen exprimiert und durch die PD-1/PD-L1- Interaktion die Anti-Tumor-Immunantwort verringert wird. PD-L1 ist bei einer Vielzahl an Tumoren, unter anderem auch bei HNSCC exprimiert (Keir, 2008), wobei verschiedene Tumoren eine sehr stark individuelle PD-L1-Expression aufweisen. Die PD-L1-Expression in den Tumoren ist dabei auch stark durch IFN- γ reguliert, welches zu einer Hochregulation von Protein-Kinase-D-Isoform 2 (PKD2) und dadurch zu einer Überexpression von PD-L1 führen kann (Chen, 2012) (Ritprajak, 2015). Im Gegensatz zu PD-L1 ist PD-L2 in der Regel bei HNSCC nicht nachweisbar (Yearley, 2017).

1.1.6 Therapiemodalitäten bei HNSCC

Für die Therapie von HNSCC-Patienten gibt es multimodale Therapiekonzepte, welche die Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie umfassen und meist in Kombination eingesetzt werden. Über die am besten geeigneten Therapieansätze muss individualisiert nach lokoregionärer Tumorausdehnung, Lokalisation, histopathologischen Risikofaktoren, Komorbiditäten und Allgemeinzustand des Patienten entschieden werden. Dies geschieht im Rahmen interdisziplinärer Tumorkonferenzen. Nach Möglichkeit wird jeder funktionell operable Tumor chirurgisch reseziert. Die Resektion kann transkutan von außen und/oder transoral erfolgen, wobei die transorale Roboter-assistierte Chirurgie (TORS) eine neue Behandlungsoption darstellt (Weinstein, 2012). Der chirurgische Therapieansatz kann sowohl eine kurative als auch eine palliative Absicht aufweisen. Bei dem palliativen Therapieansatz steht oftmals die Tumorkleinerung im Vordergrund, um so eine Verbesserung der Lebensqualität zu erreichen. Nach der chirurgischen Therapie kommt es allerdings, trotz ausreichenden Sicherheitsabstandes im Rahmen der Tumorsektion, in 10-30% der Fälle zu einem Lokalrezidiv (Pierik, 2021).

Zumeist erfolgt zusätzlich zur Tumorresektion die Ausräumung der zervikalen Lymphknoten, welche im Lymphabflussgebiet des Tumors liegen. Dies bezeichnet man als „Neck Dissection“, welche je nach Lymphknotenstatus unilateral oder bilateral durchgeführt wird. Zur Geweberekonstruktion im Bereich des resezierten Primärtumors stehen unterschiedliche plastische Verfahren zur Verfügung (lokale und regionale Lappen, Fernlappen, mikrovaskuläre freie Lappenplastiken). Einen Spezialfall der chirurgischen Therapie stellt die sogenannte „Salvage Surgery“ dar. Hierunter versteht man die Tumor-/Metastasenresektion bei einem Residual-/Rezidivtumor nach erfolgter Radio(chemo)therapie (Forastiere, 2003).

Eine weitere Therapieoption stellt die Strahlentherapie dar, die entweder adjuvant (nach erfolgter Tumorresektion), definitiv (als alleinige Therapie bei inoperablen Tumoren) oder palliativ eingesetzt wird. Die Strahlentherapie erfolgt standardmäßig mit ionisierender Photonenstrahlung (harte Röntgenstrahlung) oder Elektronenstrahlung, die von Linearbeschleunigern erzeugt werden (Schmoll, 2006). Meist kommt bei HNSCC eine intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT) als Weiterentwicklung der CT-gestützten, konformalen, 3D-geplanten Bestrahlung zum Einsatz (Moreno, 2019). Bei der Bestrahlung kommt es zur Energiedeposition in den Tumorzellen, die zu freien Radikalen und DNA-Schäden, wie zum Beispiel DNA-Doppelstrangbrüchen führt. Durch fehlerhafte oder fehlende Reparatur dieser Schäden kommt es zu Störungen der Zellteilung und zu verschiedenen Formen des Zelltods (Martins, 2018). Die Effizienz der Strahlentherapie wird durch eine Reihe verschiedener Faktoren beeinflusst. Dabei spielt Tumorhypoxie eine besonders große Rolle, weil der Sauerstoffmangel im Tumorgewebe den sogenannten „Sauerstoff-Verstärkungseffekt“ verhindert, durch den bei der Bestrahlung gebildete Sauerstoff-Radikale die DNA-Schädigung im Tumorgewebe zusätzlich erhöht. Als Folge haben Tumoren mit einer ausgeprägten Hypoxie ein signifikant schlechteres Ansprechen auf die Strahlentherapie (Gottgens, 2019).

Das Ziel einer adjuvanten Strahlentherapie ist die Eliminierung residueller Tumorzellen im Resektionsgebiet und im Bereich des regionären Lymphabflusses. Dies verbessert signifikant das Gesamtüberleben und das lokoregionäre Rezidivrisiko (Cooper, 2004). Um den bestmöglichen Effekt bezüglich Vorbeugung von Lokalrezidiven zu erreichen, sollte die adjuvante Radiotherapie innerhalb von 50 Tagen nach erfolgter Tumorresektion begonnen werden (Harris, 2018). In den allermeisten Fällen erfolgt die Radiotherapie als sogenannte klassische, perkutane Bestrahlung. Vor Beginn der Bestrahlung erfolgt die Durchführung eines Planungs-CT mit Berechnung der individuellen Zielvolumina für die IMRT, sowie die Anfertigung einer thermoplastischen Maske zur Fixierung des Kopfs. Bei der sogenannten interstitiellen Strahlentherapie kann durch eine lokale Dosiserhöhung (Boost), vor allem bei Karzinomen von Lippe, Haut und Mundhöhle, ein oftmals besseres Langzeitüberleben erreicht werden (Hegde, 2018). Entscheidend für die Tumorremission und die lokoregionäre Kontrolle sind bei der Strahlentherapie die Gesamtdosis, das Fraktionierungsschema und die Dauer der Bestrahlung. Die Art und Gesamtdosis der Strahlentherapie richtet sich hier stets nach dem Primärtumor, Lymphknotenstatus, sowie der vorausgegangenen Therapie.

Bei HNSCC mit einem hohen Risiko eines lokoregionären Rezidivs erfolgt in der Regel eine adjuvante Radio(chemo)therapie. Zu den Faktoren, welche ein erhöhtes Risiko für ein lokoregionäres Rezidiv mit sich bringen zählen: große Primärtumoren (T3/T4), unvollständige (R1/R2) oder knappe („Close Margins“) Tumorresektion im gesunden Gewebe, ein Einbruch in Lymph (L1)- oder Blutgefäße (V1), eine Perineuralscheideninfiltration (Pn1) oder extrakapsuläres Wachstum (ECE) (Bernier, 2004; Cooper 2004).

Bei inoperablen Tumoren besteht zumeist die Indikation zu einer definitiven/primären Radiotherapie. Dazu zählen Tumore, welche sehr ausgedehnt sind oder in einer funktionell und vital vulnerablen Region liegen. Zu den funktionell sensiblen Regionen zählt zum Beispiel der Hypopharynx, da es in diesem Bereich nach erfolgter Tumorresektion nicht selten zu einer permanenten Dys-/Aphagie kommt. Ein weiteres Anwendungsgebiet der primären Radiotherapie

sind multimorbide Patienten, bei denen eine chirurgische Therapie aufgrund mangelnder Narkosefähigkeit nicht möglich ist, oder Patienten in einer palliativen Behandlungssituation, bei denen durch die alleinige Radiotherapie eine Reduktion der Tumormasse und somit eine Beschwerdelinderung erreicht werden kann.

Die Radiotherapie und damit die Dosisplanung im Bereich des Strahlenfeldes ist heutzutage stark personalisiert. Zumeist erfolgt die Therapie des Primärtumorgebiets mit einer höheren Strahlendosis (Richtwerte 60-66Gy), wohingegen der zervikale Lymphabfluss mit einer geringeren Dosis therapiert wird (Richtwerte: N0-Hals circa 50 Gy, N+-Hals bis 60Gy). Die zumeist bessere Prognose HPV-positiver Karzinome findet Berücksichtigung bei der Therapieplanung der Radiotherapie. Hier zeigt sich eine starke Tendenz zur Dosisreduktion bei der Bestrahlung HPV-positiver Karzinome (Marur, 2017).

Die Strahlentherapie ist jedoch auch mit Nebenwirkungen behaftet, weil es trotz modernster Bestrahlungsschemata unvermeidlich ist, dass auch umgebendes Normalgewebe mit einer signifikanten Strahlendosis geschädigt wird. Bei den Nebenwirkungen wird zwischen Akuttoxizität und Spättoxizität (Itzhak, 2020) unterschieden. Eine akute Normalgewebstoxizität tritt circa zwei Wochen nach Beginn bis zum dritten Monat nach Beendigung der Strahlentherapie auf und ist meist reversibel. Hierzu zählen vor allem die strahleninduzierte Mukositis und die Candidose. Hervorgerufen werden sie durch eine lokal induzierte Entzündungsreaktion, gepaart mit erhöhtem Zellerfall bei gleichzeitig geringerer Zellproliferationsrate. Eine Spättoxizität oder chronische Toxizität entsteht meist erst circa drei Monate nach Beendigung der Therapie unter anderem durch Umbauvorgänge in den Kapillaren, woraus eine lokale Gewebshypoxie entsteht. Die Folgen sind irreversible Schäden wie Nekrosen und Fibrosierung. Zu den möglichen, chronischen Folgen einer Strahlentherapie zählen die Osteoradionekrose, Xerostomie, sowie das zervikale Lymphödem (Itzhak, 2020).

HNSCCs sind zumeist hochgradig chemosensibel. Eine Chemotherapie kann als primäre Chemotherapie (oftmals in Kombination mit einer Radiotherapie) aber auch als neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie erfolgen (Jain, 2008). Bei einer kombinierten Anwendung mit Strahlentherapie hat die Chemotherapie zusätzlich einen radiosensibilisierenden Effekt.

Bei der Behandlung von Rezidivtumoren hat sich in der klinischen Praxis das EXTREME-Schema, bestehend aus 5-Fluoruracil, Cetuximab und einem Platinderivat bewährt (Cooper, 2004; Vermorken, 2008).

1.1.7 Neue Therapieansätze bei HNSCC

Patienten mit rezidierten oder metastasierten HNSCC können durch „Salvage Surgery“, erneute Bestrahlung oder Chemotherapie behandelt werden. Sollte dies nicht möglich sein, können Immun-Checkpoint-Inhibitoren eingesetzt werden, welche mittlerweile sowohl in der Erstlinien- wie auch in der Zweilinietherapie etabliert sind. So wird in der Erstlinientherapie der Immun-Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab, ein IgG4 Antikörper gegen PD-1, eingesetzt (Burtneß, 2019).

Voraussetzung für die Indikationsstellung ist eine ausreichend hohe PD-L1-Expression innerhalb des Tumors oder eine Mikrosatelliten-Instabilität. Zur Bestimmung der PD-L1-Expression haben sich im klinischen Alltag zwei Scores durchgesetzt: TPS-Score (Anteil der Tumorzellen, welche PD-L1 positiv sind) und CPS-Score (Anteil der PD-L1 positiven Tumor- und Immunzellen im Verhältnis zu allen Tumorzellen).

Eine kürzlich veröffentlichte Phase III-Studie führte bei rezidierten oder metastasierten HNSCC einen Vergleich zwischen einer Pembrolizumab-Monotherapie, der Kombination aus Pembrolizumab mit einer Cisplatin-haltigen Chemotherapie+ 5-Fluorouracil, sowie einer Cisplatin-haltigen Therapie plus Cetuximab durch. Hierbei zeigte sich, dass die Kombination aus Chemotherapie und Pembrolizumab das Gesamtüberleben im Vergleich zur Therapie mit

Chemotherapie plus Cetuximab signifikant verbessert (HR 0,77, $p=0,0034$) (Burtness, 2019). Eine Pembrolizumab-Monotherapie war der Kombination aus Chemotherapie plus Cetuximab nicht unterlegen (HR 0,85). Patienten mit einem CPS >20 oder CPS >1 hatten ein besseres Gesamtüberleben in der Pembrolizumab-Monotherapie im Vergleich zur Chemotherapie plus Cetuximab (Burtness, 2019). Bei Versagen einer Erstlinientherapie kann in der Zweitlinientherapie neben Pembrolizumab auch Nivolumab als ein weiterer Vertreter der Immun-Checkpoint-Inhibitoren eingesetzt werden. Die Zweilinientherapie beinhaltet Patienten mit rezidivierten/metastasierten Kopf-Hals-Karzinomen, welche während oder bis zu 6 Monate nach einer Platin-basierten Chemotherapie eine Tumorprogression oder ein Rezidiv entwickelt haben. Allerdings treten auch bei einer Immuntherapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren Nebenwirkungen auf. So birgt diese die Gefahr von autoimmunen Nebenwirkungen (Colitis, Pneumonie, Thyreoiditis), welche durch eine Therapiepause und systemische Cortison-Therapie behandelt werden können (Puzanov, 2017).

Ein gewisser Anteil an Patienten erleidet unter der Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren eine Progression, dies betrifft oftmals Patienten mit HPV-negativen Karzinomen, welche mit einem Immun-Checkpoint-Inhibitor ohne zusätzliche Applikation einer Chemotherapie behandelt wurden (Saada-Bouزيد, 2017). Da diese sogenannte Hyperprogression mit einer schlechteren Prognose einhergeht, ist eine Optimierung der Therapieschemata essenziell (Saleh, 2019).

Patienten, welche aufgrund der CPS- und TPS-Scores nicht geeignet sind für eine Therapie mit einem Immun-Checkpoint-Inhibitor, erhalten zumeist eine konventionelle Chemotherapie gemäß EXTREME-Schema (Platinderivat, Cetuximab und 5-Fluorouracil) oder als TPEX-Schema mit Paclitaxel anstatt 5-Fluorouracil (Vermorken, 2008).

Grundsätzlich stellen die neuen Therapiemodalitäten mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren sehr vielversprechende Ansätze für eine Verbesserung des klinischen Verlaufs, insbesondere bei HPV-negativen HNSCC dar. Gegenwärtig werden zahlreiche Studien durchgeführt, die einerseits die Kombination einer Immun-Checkpoint Therapie mit Strahlentherapie (Sun, 2018) untersuchen und die auch eine mögliche Kombination einer MAPK-Inhibierung mit einer Immun-Checkpoint-Therapie in Betracht ziehen (Shin, 2020), wie sie erst kürzlich für Melanome und Lungenkarzinome publiziert wurden.

Da im Zentrum der erwähnten Immun-Checkpoint Therapien die PD-L1-Expression der Tumorzellen und der Zellen des Tumormikromilieus steht, sollte in der vorliegenden Promotionsarbeit systematisch die PD-L1-Expression unter Verwendung der beiden etablierten Scores an HNSCC-Kollektiven untersucht und die Verbindungen mit anderen klinischen Parametern dargestellt werden.

1.1.8 Zielsetzung

Mit der Einführung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren in die Therapie der rezidivierenden/metastasierten Kopf-Hals-Tumore hat sich seit einigen Jahren neben den klassischen Therapieoptionen (EXTREME-Chemotherapie, „Salvage Surgery“, Strahlentherapie) eine vielversprechende Therapieoption aufgetan, welche neben der Zweitlinientherapie („Second Line Failure“) nun auch zunehmend in der Erstlinientherapie („First Line Failure“) Anwendung findet. Da es einen nicht unerheblichen Anteil an Patienten ohne Therapieerfolg gibt, ist es essenziell, für die Stratifizierung der Patienten geeignete prädiktive Biomarker zu finden. Für die Immun-Checkpoint-Inhibition ist die Expression des PD-L1-Rezeptors ein wichtiger Biomarker, um ein Therapieansprechen vorherzusagen. Hierfür wurde vor allem die immunhistochemische Bestimmung der PD-L1-Expression etabliert. Diese kann durch verschiedene „Scores“ quantifiziert werden, wobei sich je nach Tumorentität vor allem der TPS („Tumor Proportion Score“ und der CPS („Combined Positivity Score“) in der klinischen Praxis durchgesetzt haben.

Es war das übergeordnete Ziel dieser Dissertation, anhand eines Kopf-Hals-Tumor-Patientenkollektivs (Strahlenklinik der LMU), welches immunhistochemisch mit einem anti-PD-L1-spezifischen Antikörper gefärbt wurde, den CPS-Score zu ermitteln und mit dem bei Kopf-Hals-Tumoren bereits etablierten TPS-Score zu vergleichen. Anhand beider „Scores“ sollten verschiedene Fragestellungen im Zusammenhang der PD-L1-Expression in Kopf-Hals Tumoren untersucht werden. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Heterogenität der PD-L1-Expression innerhalb eines Tumors. Hierzu sollten von drei verschiedenen Stenzen eines „Tissue-Micro-Arrays“ die Expressionswerte miteinander verglichen und statistisch aufgearbeitet werden. Zudem sollte die PD-L1-Expression nach beiden „Scoring“-Verfahren mit dem klinischen Endpunkt Rezidivfreiheit anhand von Kaplan-Meier-Analysen korreliert werden. Anhand einer kleineren Stichprobe von Primärtumor-/Rezidivtumor-Paaren wurde dabei untersucht, ob sich Immunphänotyp, sowie PD-L1-Expression und damit TPS-/CPS-Score im Laufe der Rezidiventstehung verändern. Ein weiteres wichtiges Einzelziel dieser Dissertation war die Korrelation der PD-L1-Expression nach beiden „Scores“ mit dem HPV-Status der Patienten, da sich HPV-positive Plattenepithelkarzinome sowohl prognostisch als auch molekularbiologisch deutlich von HPV-negativen Plattenepithelkarzinomen unterscheiden und mittlerweile als getrennte Entitäten betrachtet werden. Somit sollte dieser detaillierte Vergleich beider „Scoring“-Verfahren darüber Aufschluss geben, inwieweit bei Kopf-Hals-Tumoren für wichtige klinische Fragestellungen vergleichbare oder divergente Ergebnisse erzielt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektive

Im Rahmen der Promotion wurden Gewebeproben und klinische Daten aus den nachfolgenden drei Kollektiven verwendet. Die Kollektive beinhalten insgesamt 240 Fälle der Klinik für Strahlentherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU). Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit 20 Fälle aus einem weiteren prospektiven Kollektiv (sogenanntes „Full Bio“-Kollektiv analysiert. Diese zusätzlichen Fälle wurden ausschließlich in Abbildung 4 des Ergebnisteils berücksichtigt. Die Charakteristika dieser 20 Fälle sind in Tabelle 3 und 4 im Anhang aufgeführt.

LMU-KKG Kollektiv 2008-2013

Dieses Kollektiv (Tabelle 1) beinhaltet 108 Patienten mit einem histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom (HNSCC) von Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx. Eingeschlossen wurden Patienten ab dem 18. Lebensjahr. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 61 Jahren. Das Tumorstadium wurde gemäß der 7. Edition der UICC/ TNM-Klassifikation bestimmt. Die Patienten erhielten zwischen 2008-2013 nach erfolgter Tumorresektion eine adjuvante Radio(chemo)therapie an der Klinik für Strahlentherapie der LMU München. Die Indikation zur adjuvanten Strahlentherapie wurde bei großem Primärtumor (pT3/pT4), einem pN1-Status, „Close Margins“ (<5mm), R1/R2 Resektion oder einem nicht vorbestrahlten Rezidivtumor gestellt. Die Bestrahlungsdosen betragen 64-66 Gy für das ehemalige Tumorbett und für den zervikalen Lymphabflussweg 50-60 Gy (abhängig vom Ausmaß der regionären Lymphknotenmetastasen). Es wurde eine konformale, 3D-gestützte Strahlentherapie oder Intensitäts-modulierte Strahlentherapie (IMRT) angewandt. Patienten mit „Close Margins“, R1/R2-Resektion, sowie Vorliegen von extrakapsulärem Wachstum (ECE) erhielten zusätzlich eine Chemotherapie (n=59, 55%). Diese erfolgte zumeist mit einer Kombination aus Cisplatin und 5-Fluorouracil. Die Bestimmung des HPV-Status erfolgte in Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München. Dies geschah mittels immunhistochemischer Färbung von p16^{INK4a} (siehe Abschnitt 2.2.3). Darüber hinaus erfolgte mittels real-time PCR(q-PCR) der Nachweis von HPV auf DNA-Ebene. Hierzu wurden generelle PCR-Primer (GP5+/6+) verwendet, die alle vorwiegend in der Mukosa auftretenden HPV-Typen abdecken und dabei die L1-Gene detektieren (siehe Abschnitt 2.2.3). Ausschließlich Fälle, die sowohl immunhistochemisch p16^{INK4a} als auch GP5+/6+ PCR positiv waren, wurden als HPV-positiv klassifiziert. Nach dieser kombinierten Analyse hatten 79% der Patienten (n=85) einen negativen HPV-Status, 21% (n=23) waren HPV-positiv. Die Datenerfassung zum klinischen Verlauf nach durchgeführter Therapie erfolgte durch die Kliniken für Strahlentherapie, sowie Hals-, Nasen-Ohrenheilkunde der LMU München im Rahmen der klinischen Kooperationsgruppe „Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer“ der LMU München (LMU-KKG). Der klinische Endpunkt Rezidivfreiheit („Freedom from Recurrence“; RF) wurde ab dem ersten Tag der Strahlentherapie für eine Nachbeobachtungszeit von mindestens 3 Jahren nach Strahlentherapie mittels Reverse-Kaplan-Meier-Analyse bestimmt. Fünf der Fälle sind sowohl Teil des LMU-KKG Kollektivs 2008-2013 (Primärtumoren P002, P003, P008, P015, P034) als auch Teil des Rezidiv-Kollektivs (Primärtumor/Rezidivtumor Pärchen). Bei den statistischen Auswertungen wurde dies berücksichtigt und die Fälle jeweils nur in einem Teilkollektiv gewertet.

Das LMU-KKG Kollektiv 2008-2013 wurde bereits hinsichtlich der klinischen Charakteristika veröffentlicht (Maihoefer, 2018). Die Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebe zu diesem Kollektiv wurden im Rahmen der Routinediagnostik am Institut für Pathologie der LMU hergestellt und für das Projekt zur Verfügung gestellt. Von diesen FFPE-Gewebeblöcken wurden im

Rahmen einer anderen medizinischen Promotionsarbeit von Tim Herkommer und in Zusammenarbeit mit der Abteilung Analytische Pathologie am Helmholtz Zentrum München „Tissue-Micro-Arrays“ (TMA) mit jeweils drei Stenzen aus jedem Tumor hergestellt. Die klinischen Verlaufsdaten wurden in der LMU-Klinik für Strahlentherapie zusammengestellt.

LMU-KKG Kollektiv 2013-2016

Dieses Kollektiv 2013-2016 (Tabelle 1) gleicht bezüglich Diagnose, Therapie und Zusammensetzung dem Kollektiv 2008-2013 (Tabelle 1). Es besteht aus 112 Patienten mit einem Altersdurchschnitt von 61 Jahren. 72% (n= 81) der Fälle weisen einen negativen HPV-Status auf, 28% (n=31) sind HPV-positiv. Ebenso wurde der klinische Endpunkt Rezidivfreiheit für eine Nachbeobachtungszeit von mindestens 3 Jahren nach Strahlentherapie wie oben dargestellt bestimmt. Fünf der Fälle sind sowohl Teil des LMU-KKG Kollektivs 2013-2016 (Primärtumoren P005, P010, P012, P036, P038) als auch Teil des Rezidiv-Kollektivs (Primärtumor/Rezidivtumor Pärchen). Bei statistischen Auswertungen wurde dies berücksichtigt und die Fälle nur jeweils in einem Teilkollektiv gewertet. Die FFPE-Gewebe zu diesem Kollektiv wurden ebenfalls im Rahmen der Routine-Diagnostik am Institut für Pathologie der LMU hergestellt und für das Projekt zur Verfügung gestellt. Von diesen FFPE-Gewebeblöcken wurden im Rahmen zweier anderer medizinischer Promotionsarbeiten von Ramin Dazeh und Thaina Matos, sowie in Zusammenarbeit mit der Abteilung Analytische Pathologie am Helmholtz Zentrum München „Tissue-Micro-Arrays“ (TMA) mit jeweils drei Stenzen aus jedem Tumor hergestellt. Die klinischen Verlaufsdaten wurden in der LMU-Klinik für Strahlentherapie zusammengestellt. Die klinischen Charakteristika der Tumoren sind für einen Teil des Kollektivs bereits im Rahmen einer früheren Publikation veröffentlicht worden (Maihoefer, 2018).

Rezidiv-Kollektiv

Das Rezidiv-Kollektiv besteht aus 20 Primärtumor/Rezidivtumor Pärchen, für die FFPE-Schnitte von Patienten mit einem histologisch gesicherten lokoregionären Rezidiv eines HNSCC-Primärtumors von Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx oder Larynx zur Verfügung standen. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 59 Jahren. Alle Fälle wiesen einen negativen HPV-Status auf. Von den 20 Fällen sind insgesamt 10 Fälle mit ihrem Primärtumor zusätzlich in einem der oben genannten LMU-KKG-Kollektive enthalten. Bei statistischen Auswertungen wurde dies berücksichtigt, indem die überlappenden Primärtumoren nur in einem Kollektiv eingeschlossen wurden. Alle Patienten hatten für den Primärtumor eine kurative Radio(chemo)therapie erhalten, wobei 70% der Patienten (n=14) eine adjuvante (postoperative) Strahlentherapie und 30% (n=6) eine definitive Radio(chemo)therapie erhielten. Einschlusskriterien waren ein lokales oder lokoregionäres Rezidiv im Haupt-Dosisfeld nach erfolgter Radiotherapie, sowie ein Lokalrezidiv innerhalb von drei Jahren nach Erstdiagnose. Nach durchschnittlich 330 Tagen kam es zum Auftreten eines lokoregionären Rezidivs im Hochdosis-Feld der Strahlentherapie. Ein lokoregionäres Rezidiv wurde definiert als ein Tumor, welcher frühestens sechs Monate bis spätestens 3 Jahre nach Beendigung der Strahlentherapie auftrat (Braakhuis, 2002). Das Tumorstadium wurde unter Verwendung der 7. Edition der UICC/TNM-Klassifikation erhoben. Die FFPE-Gewebe der Fälle wurden im Rahmen der Routine-Diagnostik am Institut für Pathologie der LMU hergestellt und für das Projekt zur Verfügung gestellt. Die klinischen Verlaufsdaten wurden in der LMU-Klinik für Strahlentherapie zusammengestellt. Das Rezidiv-Kollektiv zeichnet sich dadurch aus, dass es aus Primär- und Rezidivtumor-Paaren besteht. Deshalb wurde es zur Überprüfung der Hypothesen, dass sich die PD-L1-Expression, sowie die Heterogenität der PD-L1-Expression auf dem Weg der Rezidiventstehung ändert (TPS, CPS-Scores) verwendet.

Dieses Tumorkollektiv wurde bereits im Rahmen einer vorangegangenen Publikation zu molekularen Subtypen in HNSCC-Tumoren hinsichtlich der klinischen Charakteristika veröffentlicht (Weber, 2022).

	LMU-KKG 08-13 (n=108)	LMU-KKG 13-16 (n=112)	Rezidiv- Kollektiv(n=20)
	Patientenzahl (%)	Patientenzahl (%)	Patientenzahl (%)
Alter (Jahre)	Median 61 Jahre	Median 61 Jahre	Median 59 Jahre
<45	4(4%)	4(4%)	0(0%)
45-54	22(21%)	21(19%)	5(25%)
55-64	40(37%)	44(39%)	11(55%)
65-74	35(32%)	37(33%)	3(15%)
>75	7(6%)	6(5%)	1(5%)
Geschlecht			
männlich	75(69%)	89(79%)	15(75%)
weiblich	33(31%)	23(21%)	5(25%)
Tumorlokalisation			
Hypopharynx	16(15%)	8(7%)	3(15%)
Larynx	13(12%)	21(19%)	3(15%)
Mundhöhle	27(25%)	27(24%)	7(35%)
Oropharynx	52(48%)	56(50%)	7(35%)
HPV-Status			
negativ	85(79%)	81(72%)	20(100%)
positiv	23(21%)	31(28%)	0(0%)
Raucherstatus			
Nichtraucher	9(8%)	5(4%)	1(5%)
Raucher	71(66%)	104(93%)	7(35%)
nicht bestimmt	28(26%)	3(3%)	12(60%)
UICC TNM-Stadium			
I	2(2%)	1(1%)	0(0%)
II	10(9%)	19(17%)	2(10%)
III	31(29%)	33(29%)	6(30%)
IV	65(60%)	59(53%)	12(60%)
T-Stadium			
T1	19(17%)	8(7%)	2(10%)
T2	44(41%)	57(51%)	5(25%)
T3	28(26%)	27(24%)	5(25%)
T4	17(16%)	20(18%)	8(40%)
N-Stadium			
N0	31(29%)	37(33%)	6(30%)
N1	25(23%)	25(22%)	5(25%)
N2	50(46%)	45(40%)	9(45%)
N3	2(2%)	2(2%)	0(0%)
nicht bestimmt	0(0%)	3(3%)	0(0%)

M-Stadium			
M0	108(100%)	112(100%)	20(100%)
M1	0(0%)	0(0%)	0(0%)
nicht bestimmt	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Lymphovask. Invasion (LVI)			
nein (L0)	74(69%)	77(69%)	12(60%)
ja (L1)	23(21%)	34(30%)	3(15%)
nicht bestimmt	11(10%)	1(1%)	5(25%)
Venöse Tumorinvasion (VTI)			
nein (V0)	96(89%)	107(95%)	13(65%)
ja(V1)	2(2%)	3(3%)	2(10%)
nicht bestimmt	10(9%)	2(2%)	5(25%)
Perineurale Invasion (PNI)			
nein (Pn0)	58(54%)	97(87%)	10(50%)
ja (Pn1)	19(17%)	13(11%)	3(15%)
nicht bestimmt	31(29%)	2(2%)	7(35%)
Resektionsstatus			
R0	79(73%)	93(83%)	9(45%)
R1	26(24%)	19(17%)	5(25%)
nicht bestimmt	3(3%)	0(0%)	6(30%)
Extrakaps. Wachstum (ECE)			
nein	78(72%)	83(74%)	7(35%)
ja	29(27%)	26(23%)	6(30%)
nicht bestimmt	1(1%)	3(3%)	7(35%)
Grading			
1(gut differenziert)	2(2%)	1(1%)	2(10%)
2(moderat differenziert)	39(36%)	38(34%)	8(40%)
3(schlecht differenziert)	67(62%)	71(63%)	10(50%)
nicht bestimmt	0(0%)	2(2%)	0(0%)
Radiotherapie			
adjuvant	108(100%)	112(100%)	14(70%)
definitiv	0(0%)	0(0%)	6(30%)
Chemotherapie			
nein	49(45%)	53(47%)	7(35%)
ja	59(55%)	59(53%)	13(65%)
Rezidiv			
nein	91(84%)	90(80%)	0(0%)
ja	17(16%)	22(20%)	20(100%)

Tabelle 1: Summarische Tabelle der drei Kollektive

Aufarbeitung der Gewebeproben

Erstellung von FFPE-Präparaten

Alle FFPE-Präparate wurden im Rahmen der Routine-Diagnostik am Institut für Pathologie der LMU nach einem Standardverfahren erstellt (Canene-Adams, 2013). Für jeden Patienten und Tumor existieren mehrere FFPE-Routineblöcke, wobei jeweils nur Blöcke mit dem größten Tumoranteil und möglichst wenig Nekrosen verwendet wurden. Nachfolgend ist die Vorgehensweise kurz beschrieben. Um nach Entnahme von repräsentativen Gewebeproben aus dem Operationspräparat eine Autolyse der Zellen zu verhindern, musste das Gewebe durch eine entsprechende Fixierung in eine konservierte Form gebracht werden. Danach erfolgte die Herstellung von FFPE-Präparaten, indem die fixierten Gewebeproben in Paraffinblöcke eingebettet wurden.

Die Aufarbeitung der Gewebeproben für eine histopathologische Analyse gliedert sich in vier Schritte:

a) Fixierung

Die Fixierung der aus dem Operationspräparat entnommenen Gewebeproben erfolgte mit einer verdünnten und neutral gepufferten 4%-Formaldehyd-Lösung (Microcos, Garching, Deutschland). Die Fixierung wurde bei Raumtemperatur und abhängig von der Größe des Gewebes für 8-18 Stunden durchgeführt. Durch diesen Schritt kam es zur Vernetzung und Denaturierung von Proteinen innerhalb des Gewebes. Es folgte abschließend das Spülen des Gewebes mit Leitungswasser.

b) Einbettung

Um das Gewebe adäquat schneiden zu können, wurde es in Paraffin eingebettet, um eine ausreichende Stabilität und Konsistenz zu erreichen. Da das zur Einbettung verwendete Paraffin (Histotec-Pastillen, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, USA) nicht wasserlöslich ist, musste dem Gewebe zunächst mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-96-96-100-100-100%) das Wasser entzogen werden. Der Alkohol wurde dabei mit Aqua dest. gepuffert. Nach Auswaschen des Alkohols durch Xylol erfolgte die Einbettung in heißem Paraffinwachs in einer Blockform. Die Paraffin-Blöcke weisen nach Abkühlung eine ausreichende Stabilität für die weitere Verarbeitung auf und können aus der Blockform gelöst werden.

c) Herstellen von FFPE-Serienschnitten

Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte in einer entsprechenden Haltevorrichtung mittels Schlitten-oder Rotationsmikrotom. Es wurde von jedem Fall eine Serie von aufeinanderfolgenden Mikrotom-Schnitten angefertigt, welche sowohl für die HE-Färbungen wie auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden. Hierbei wurde der erste und der letzte Schnitt einer Serie jeweils für die Anfertigung von HE-Schnitten verwendet. Diese HE-Schnitte dienen der histologischen Überprüfung, ob in allen Schnitten der Serie Tumorbereiche vorhanden waren. Es wurde für die HE- und IHC-Färbungen folgendes Standard-Schnittmuster verwendet: HE(3 μ m) -10x3 μ m-10x10 μ m-HE(3 μ m). Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich die 3 μ m-Schnitte verwendet. Der jeweilige Schnitt einer jeden Serie wurde vom Messer abgehoben und in ein Warmwasserbad überführt. Dieser Schritt diente dem Glätten des Präparats, bevor es auf einen Objektträger aufgezogen wurde.

d) Durchführung der Hämatoxylin/Eosin (HE) -Färbung:

Der Ablauf der HE-Färbung gliedert sich in folgende Schritte (Sampias, 2022):

- Entwachsen des Paraffinschnitts mit Xylol
Zunächst mussten die Paraffinschnitte vom hydrophoben Wachs mit Hilfe von Xylol gereinigt werden, um sie für wässrige Reagenzien zugänglich zu machen.
- Rehydrierung mit absteigender Alkoholreihe
Die Rehydrierung und Entfernung des Xylols erfolgte mit einer absteigenden Alkoholreihe (100-96-70%) und Spülung mit Leitungswasser. Als Puffer für die Alkoholreihe wurde Aqua dest. verwendet. Danach war der Schnitt für wässrige Lösungen zugänglich.
- Hämatoxylin-Kernfärbung
Es erfolgte die Färbung mit dem Kernfarbstoff Hämatoxylin (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland). Dieser besteht aus dem Farbstoff Hämatein, welcher durch Oxidation von Hämatoxylin entsteht, sowie einem Beiz-/Bindemittel (Aluminiumsalz), welches in Lösung vorliegt. Durch das Beizmittel wurde die Kapazität des Hämateins zur Bindung an anionische Gewebekomponenten erhöht. Die Zellkerne färbten sich rötlich.
- Bläuung
Durch die Behandlung mit einer schwach alkalischen Lösung (sogenannte Bläuung) bekam der Schnitt und hier vor allem die Zellkerne ihre charakteristische bläuliche Farbe. Es erfolgte eine erneute Spülung mit Leitungswasser, sowie zur Qualitätskontrolle der Färbung eine Überprüfung des Kontrasts und der Hintergrundfärbung im Durchlichtmikroskop
- Differenzierung
Je nach verwendetem Hämatoxylin war eine Entfärbung mit schwach saurem Alkohol nötig, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren. Darauf folgten eine erneute Bläuung und Spülung mit Leitungswasser.
- Eosin-Färbung
Durch die Eosin-Färbung mit Eosin-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) auf Wasser- oder Alkoholbasis wurden nicht-nukleäre Strukturen in verschiedenen Rottönen gefärbt.
- Entwässern mit aufsteigender Alkoholreihe und Klärung
Es erfolgte das Entwässern des Schnittes mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-96-96-100%) und die erneute Klärung mit Xylol. Als Puffer für die Alkoholreihe wurde Aqua dest. verwendet.
- Eindecken des Objektträgers mit Deckglas
In einem nächsten Schritt wurden die Objektträger mittels Deckglases unter Verwendung eines entsprechenden Eindeckmediums (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) eingedeckt.

Die genannten Schritte zur Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgten im Rahmen der Routinediagnostik in Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München (Abteilung für Analytische Pathologie). Die HE-Färbungen wurden durch eine automatisierte Färbemethode mittels „Multistainer Histo Core Spectra ST“ unter Verwendung des HE-Färbekits „ST Infinity H+E Staining System“ (Beide von Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland) durchgeführt.

Um zu gewährleisten, dass die weiteren Analysen an Tumorgewebe erfolgen, wurden die HE-gefärbten Gewebeschnitte von einem Pathologen histopathologisch beurteilt und die Tumoreale unter dem Mikroskop eingezeichnet

Erstellung von Tissue-Micro-Arrays (TMA)

Ein „Tissue-Micro-Array“ (TMA) ermöglicht die gleichzeitige Analyse vieler Gewebeproben, deren Positionen auf dem „Array“ eindeutig durch Koordinaten festgelegt sind (Jawhar, 2009). Für die Zusammenstellung von TMAs wurden alle HE-gefärbten FFPE-Tumorschnitte der entsprechenden Fälle mikroskopiert und geeignete Gewebeblöcke mit möglichst wenig Nekrosen und klarer Tumorzellmorphologie ausgewählt. Alle Gewebeproben wurden von einem Pathologen histopathologisch begutachtet und das Tumoreal definiert. Aus den definierten Tumorbereichen wurden am Helmholtz Zentrum München (Abteilung Analytische Pathologie) pro Patient drei repräsentative Gewebestanzen (1,0 mm Durchmesser) für den TMA entnommen. Anschließend erfolgte analog zu den FFPEs die Produktion von Serienschnitten für die Anfertigung von HE- und immunhistochemischen Färbungen, jeweils mit HE-Schnitt am Beginn und am Ende jeder Serie. Jeder Objektträger enthielt neben den Tumorstanzen eine Negativ-Kontrolle (oben rechts) zur Orientierung, sowie eine Positiv-Kontrolle (zum Beispiel HNSCC der Tonsille), um so die Funktion der Antikörperfärbung zu überprüfen.

Der Vorteil der TMA-Technologie ist die vergleichende Durchführung von histologischen oder molekularen Analysen mehrerer Tumorfälle auf einem Objektträger. Die TMA-Schnitte werden dazu verwendet, um verschiedene Zielstrukturen auf Proteinniveau (Immunhistochemie) oder DNA- und RNA-Niveau (In-situ-Hybridisierung) sichtbar zu machen (Moch, 2001). Durch die gleichzeitige Analyse auf einem Objektträger ist ein schnellerer und effizienterer Arbeitsablauf möglich und auch große Patientenkollektive können somit auf die prognostische Relevanz biologischer Variablen untersucht werden (Milanes-Yearsley, 2002). Zudem erlaubt die TMA-Technologie ein hohes Maß an Standardisierung der nachfolgenden Färbungen und Analyseverfahren für die enthaltenen Einzelfälle.

Für die oben genannten Tumor-Kollektive wurden je drei Stanzen pro Tumor in einem TMA zusammengeführt.

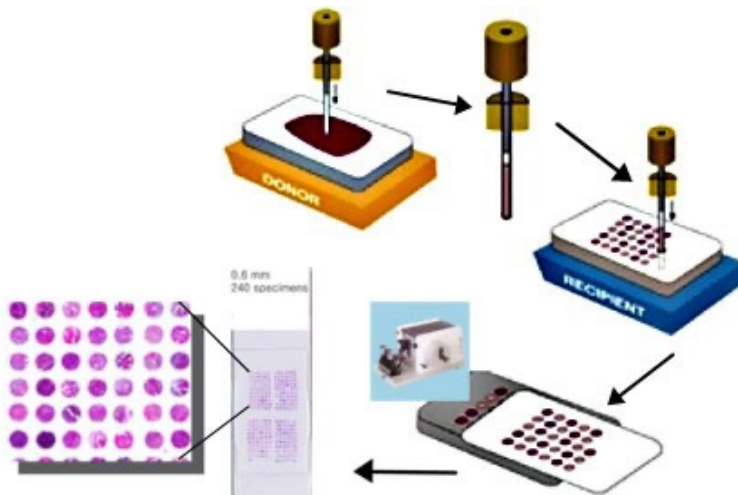


Abbildung 1: Herstellung eines TMA (Alphamatrix, 2005)

2.2 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Walz durchgeführt.

Die immunhistochemische Färbung beruht auf dem Prinzip einer Detektion und Anfärbung von einem spezifischen Antigen in Paraffin-fixierten, histologischen Gewebeschnitten. Dabei wurde ein Primärantikörper mit einer hohen Affinität zu dem spezifischen Abschnitt des Antigens, dem sogenannten Epitop, verwendet (antikoerper-online.de).

Es gibt verschiedene Methoden der Immunfärbung (direkt, indirekt, dreistufige Methode, PAP), wobei in der vorliegenden Arbeit die indirekte Nachweismethode mittels „OptiView DAB Detection Kit“ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona, USA) verwendet wurde. Der gesamte Färbeprozess, einschließlich der verschiedenen Antikörper-Inkubationen, wurde mit Hilfe eines Ventana Färbeautomaten (Ventana Benchmark Series, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona, USA) durchgeführt. Der spezifisch gebundene Primärantikörper wurde dabei durch einen spezifischen Sekundärantikörper erkannt. Dieser Komplex wurde anschließend durch einen enzymmarkierten Tertiärantikörper gebunden, welcher mit einem Wasserstoffperoxidsubstrat und einer 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Substratlösung (DAB) visualisiert wurde. Die Folge war eine braune Anfärbung in den PD-L1-exprimierenden Zellen. Nach Ablauf der Primärantikörper-spezifischen Inkubationszeit erfolgte das Auswaschen der ungebundenen Moleküle innerhalb des Schnittes. Durch das Auftragen von „Liquid Coverslip“ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona, USA) wurde abschließend eine Protektion gegen Verdunstung der wasserhaltigen Reagenzien erreicht (ventana.com, 2011).

2.2.1 Durchführung der PD-L1-Färbung

Die immunhistochemische PD-L1 Färbung ist in einem hohen Maß standardisiert und automatisiert (Prichard, 2015). Neben der Standardisierung ist eine hohe Sensitivität, Spezifität, sowie eine gute Vergleichbarkeit der PD-L1-Färbung zwischen verschiedenen Untersuchern (sogenannte Konkordanz) essenziell. Dies wird erreicht durch die Verwendung spezifischer, validierter Primärantikörper und vollautomatischer, zertifizierter Färbeautomaten, welche einer regelmäßigen Qualitätsüberwachung unterliegen (Schildhaus, 2018). Ein weiterer wichtiger Faktor zur Qualitätssicherung der immunhistochemischen Färbung sind die internen Negativ- und Positiv-Kontrollen auf dem TMA, sowie die externe Positiv-Kontrolle, welche in den Ablauf der Färbung unter Verwendung des Ventana-Färbeautomaten integriert sind.

Vorbehandlung

Material:

Ultra Cell Conditioning Solution CC1 (Ventana/Roche, Handbuch: ventana.com, 2014)

Methode:

Hitzeinduzierte Vorbehandlung (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER)

Die Quervernetzung von Proteinen im Rahmen der FFPE-Herstellung hat den Nachteil, dass bestimmte Epitope von dem passenden Antikörper nicht mehr richtig erkannt werden können. Dies ist bedingt durch die Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen der Aldehydgruppe des Fixativs und der Aminogruppe des Proteins. Weiterhin führt der Formaldehyd durch Ausbildung von Methylenbindungen zum „Crosslinking“ von Proteinen.

Durch eine hitzeinduzierte Vorbehandlung mit sogenannten „Retrieval“-Lösungen, kann durch Renaturierung von Antigenen die Demaskierung von Epitopen erfolgen (Krenacs, 2010). Die Folge ist eine höhere Rezeptoraffinität der zugegebenen Primärantikörper (Yamashita, 2017). Ultra CC1 ist ein Tris-basierter Puffer (Handbuch: ventana.com, 2014) mit einem leicht basischen PH-Wert, welcher unter Hitzebedingungen zur Hydrolyse der kovalenten Bindungen führt. Die Präparate wurden im Rahmen des automatisierten Färbeprogangs der Ventana Benchmark Ultra (Ventana/Roche) zunächst auf die adäquate Temperatur erhitzt, bevor der Puffer unverdünnt hinzugegeben wurde. Anschließend erfolgte die PD-L1-Färbung (ventana.com, 2014).

Durchführung der PD-L1-Färbung

Material:

Plattform:	Ventana Benchmark Ultra (Ventana/Roche)
Primärantikörper:	Monoklonaler Antikörper SP263 von Ventana Medical Systems (Ventana/Roche).
Inkubationszeit:	16 Minuten
Verdünnung:	Unverdünnt (nach Herstellerangaben im Protokoll: ventana.com,2014)
Detektionssystem:	Opti View DAB IHC Detection Kit (Ventana/Roche)
Externe Kontrolle:	Positiv: PD-L1-exprimierendes Nierengewebe
Präparate:	FFPE-Gewebeproben aus dem Institut für Pathologie der LMU Tissue-Mikro-Arrays mit jeweils drei Tumorstanzen pro Patienten

Methode:

Mit dem automatisiertem Färbesystem Ventana Benchmark Ultra, sowie dem anti-PD-L1 spezifischem monoklonalen Antikörper SP263 wurde nach adäquater Vorbehandlung (siehe oben) die PD-L1-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde das Ventana-Programm CC164 verwendet. Der oben genannte Primärantikörper wurde im Rahmen des Färbeprogramms für 16 Minuten inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationszeit erfolgte das Auswaschen nicht gebundener Antikörper, um somit in einem zweiten Arbeitsschritt die Bindung von Sekundärantikörpern an die Primärantikörper zu ermöglichen. Diese Sekundärantikörper bewirkten eine Signalverstärkung und somit eine stärkere immunhistochemische Anfärbung. Sofern nur eine geringe Anzahl an Epitopen vorliegt, kann die Färbung durch zusätzliche Anwendung von Tertiärantikörpern (welche an die Sekundärantikörper binden) zusätzlich verstärkt werden. Wichtig ist dabei das Auswaschen nicht gebundener Antikörper nach jedem Arbeitsschritt, welches ebenfalls automatisiert geschah. Für den Primärantikörper SP263 wurden zwei Kontrollebenen zur Validierung der Färbung angewandt: Als Positiv-Kontrolle wurde in der Ventana PD-L1- positives Nierengewebe verwendet. Zusätzlich erfolgte eine interne Positiv-und Negativ-Kontrolle auf dem TMA (siehe Abschnitt TMA-Herstellung).

2.2.2 Immunphänotypen

Bereits im Jahre 2009 wurden beim kolorektalen Karzinom drei verschiedene Immunphänotypen beschrieben: „cold“, „altered“ und „hot (Camus, 2009). Die Immunphänotypen beschreiben den Grad der Infiltration von CD3 und CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen innerhalb des Tumors und im Tumormikromilieu (Galon, 2014). Ein Tumor wird als „hot“ bezeichnet, wenn er eine hohe T-Zell-Infiltration aufweist und als „cold“, wenn nur wenige T-Zellen vorhanden sind. Der Immunphänotyp „altered“ setzt sich aus den zwei Subtypen „immunosuppressed“ und „excluded“ zusammen. Bei dem Subtyp „excluded“ ist der Tumor durch Mechanismen des „Immune Escape“ in der Lage, die intratumorale Infiltration von T-Zellen und

somit eine adäquate Immunantwort zu verhindern. Die Folge ist eine höhere Konzentration an CD3+ und/oder CD8+-T-Zellen in der Marginalzone/Invasionszone des Tumors bei deutlich verringerter intratumoraler Immunzell-Infiltration. Der Subtyp „immunosuppressed“ ist hingegen durch eine Infiltration des Tumors durch Immunzellen charakterisiert, welche jedoch keine Interaktion mit den Tumorzellen eingehen (Galon, 2019).

Durchführung der Färbung zur Immunphänotypisierung (CD3 und CD8)

Zur Bestimmung der oben genannten Immunphänotypen sind zusätzliche immunhistochemische Färbungen nötig. Hierbei nutzt man die selektive Anfärbung von den Oberflächen-Antigenen CD3 (Cluster of Differentiation 3) und CD8 (Cluster of Differentiation 8). CD3 ist ein Transmembran-Glykoprotein der T-Lymphozyten und induziert die Expression des T-Zell-Rezeptors, der für die Signaltransduktion innerhalb der T-Zelle verantwortlich ist. CD8 ist ein Membranprotein von zytotoxischen T-Zellen und zuständig für die Bindung der T-Zelle an die Antigen-präsentierende Zelle.

CD3-Färbung:

Material:

Vorbehandlung:	CC1 (Ventana/Roche)
Plattform:	Ventana Benchmark Ultra (Ventana/Roche)
Antikörper Klon:	SP7 (Zytomed)
Verdünnung:	1:150
Detektionssystem:	Ultra View DAB IHC Detection Kit (Ventana/Roche)
Inkubationszeit für Primärantikörper:	28min
Externe Kontrolle:	CD3-positives Tonsillengewebe

Methode:

Die Durchführung der CD3-Färbung erfolgte analog zur PD-L1-Färbung mit der automatisierten Ventana Benchmark Ultra nach entsprechender Vorbehandlung mit der CC1. Der SP7-Primärantikörper wurde im Rahmen des Färbeprogramms für 28 Minuten inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte (Bindung Primär-, Sekundär- und Tertiärantikörper) verhalten sich analog zu Abschnitt 2.2.1

CD8-Färbung:

Material:

Vorbehandlung:	CC1 (Ventana/Roche)
Plattform:	Ventana Benchmark Ultra (Ventana/Roche)
Antikörper Klon:	C8-144B, CellMarque
Verdünnung:	1:50
Detektionssystem:	Ultra View DAB IHC Detection Kit (Ventana/Roche)
Inkubationszeit für Primärantikörper:	24Minuten
Externe Kontrolle:	CD8-positives Tonsillengewebe

Methode:

Die Durchführung der CD8-Färbung erfolgte analog zur CD3-Färbung, jedoch wurde hierbei der Primärantikörper C8-144B für 24 Minuten inkubiert.

Die weiteren Arbeitsschritte (Bindung Primär-, Sekundär- und Tertiärantikörper) verhalten sich analog zu Abschnitt 2.2.1

2.2.3 Bestimmung des HPV-Status

Die Bestimmung des HPV-Status erfolgte immunhistochemisch und mittels PCR-Nachweis in Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München, Abteilung für Strahlenzytogenetik.

Immunhistochemischer HPV-Nachweis (p16^{INK4a})

P16^{INK4a} ist ein Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor, welcher in HPV-positiven Zellen überexprimiert ist (Hashmi, 2020). Zugrunde liegt hier, dass die Expression des Onkoproteins E7 zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens RB führt. Die negative „Feedback“-Kontrolle von Rb auf die p16-Expression entfällt und führt zu einer erhöhten Expression von p16 (siehe Abschnitt 1.1.1).

Material:

Vorbehandlung:	CC1 (Roche/Ventana)
Plattform:	Ventana Benchmark Ultra (Ventana/Roche)
Antikörper Klon:	E6H4 (Roche/Ventana)
Verdünnung:	Unverdünnt (nach Herstellerangaben im Protokoll: ventana.com,2014)
Inkubationszeit für	
Primärantikörper:	28min
Detektionssystem:	Ultra View Universal DAB Detection Kit (Roche)
Externe Kontrolle:	Seröses Endometrium-Karzinom

Methode:

Die Durchführung der p16-Färbung erfolgte analog zur PD-L1-Färbung mit der Ventana Benchmark Ultra nach entsprechender Vorbehandlung mit der CC1. Die Inkubationszeit für den verwendeten Antikörper E6H4 lag hier bei 28 Minuten. Bei einer nukleären und zytoplasmatischen Färbung von mehr als 70% der Tumorzellen wurde der Fall als p16-positiv gewertet.

Molekularbiologische HPV-Detektion

FFPEs von p16-positiven (UPCI SCC154) and p16-negativen HNSCC-Zelllinien (Cal33) wurden als Positiv- und Negativ-Kontrolle verwendet. Bei einer positiven Färbung von mehr als 70% der Tumorzellen wurde der Fall als HPV-positiv gewertet (Ang, 2010). Zur Detektion von falsch-positiven Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung erfolgte zusätzlich der quantitative Nachweis von HPV-DNA mittels real-time PCR (q-PCR) in Kombination mit SYBR (Clontech Laboratoris, Inc., Mountain View, CA, USA). Die DNA-Proben wurden mittels ViiA 7 q-PCR-System (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) unter Verwendung von GP5+/6+ Primern (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) (forward-primer: 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3', reverse-primer: 5'GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'; Amplifizierungsgröße: 142 bp) (Hesselink, 2005) zur Detektion der L1-Gene analysiert. Zur Qualitätskontrolle wurde das Beta-Globin-Gen verwendet (forward-primer: 5'-CAGGTACGGCTGTCATCACTTAGA-3', reverse-primer: 5'-CAT-GGTGTCTGTTTGAGGTTGCTA-3'; Amplifizierungsgröße: 185 bp) (Metabion

International AG, Planegg-Martinsried, Germany) (Lind, 2007). Zur Kontrolle wurden zwei HPV-negative (Cal27 and Cal33) und zwei HPV-positive (UPCI SCC2 and UPCI SCC154) Zelllinien verwendet (Wintergerst, 2018). Die Reaktionen wurden in dreifacher Ausführung unter Verwendung der oben genannten Kontrollen durchgeführt. Bei fehlendem Nachweis einer HPV-Amplifikation wurde bei einem nachweisbaren Beta-Globulin-PCR-Produkt (Ct-Wert < 35) der Fall als HPV-negativ bewertet. Ein Fall wurde als HPV-positiv gewertet, wenn sowohl p16^{INK4a} immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte als auch der HPV-DNA-PCR-Nachweis mittels GP 5+/6+-Primern (Smeets, 2007) positiv war. Ein positiver p16^{INK4a}-Nachweis bei negativer PCR wurde als falsch-positiver Fall gewertet.

2.3 Scores zur PD-L1-Testung

Zur Bestimmung der immunhistochemischen „Scores“ wurde das Lichtmikroskop Axioplan von Zeiss mit 10x, 20x, 40x und 63x Objektiven verwendet. Dabei wurde ein Okular mit einer 10x Nachvergrößerung verwendet. Die Bestimmung des jeweiligen immunhistochemischen „Scores“ erfolgte bei einer 200x Vergrößerung, so dass im Gesichtsfeld circa 100 Tumorzellen sichtbar waren. Es folgte die Auszählung der ausgewählten Zellen je nach „Score“ (TPS-Score: PD-L1-exprimierende Tumorzellen, CPS-Score: PD-L1-exprimierende Tumor- und Immunzellen) und die Berechnung gemäß der entsprechenden Formel (siehe unten: TPS-/CPS-Score). Für eine aussagekräftige PD-L1-Erhebung sollten mindestens 100 Tumorzellen pro Präparat vorhanden sein.

Tumor Proportion Score (TPS)

Der TPS-Score wird ausschließlich aus Tumorzellen gebildet und bezeichnet die Anzahl an PD-L1 gefärbten Tumorzellen, geteilt durch die Gesamtheit aller Tumorzellen (PD-L1 positiv und PD-L1 negativ) (Schildhaus, 2018). Gezählt werden bei den gefärbten Tumorzellen ausschließlich Zellen mit einer membranständigen Färbung. Die Intensität und Vollständigkeit der Färbung werden dabei nicht berücksichtigt. Immunzellen, auch wenn Sie eine PD-L1-Färbung aufweisen, werden nicht gezählt. Der TPS-Score wird in % angegeben.

$$\text{TPS}(\%) = \frac{\text{PD - L1 - positive Tumorzellen}}{\text{Gesamtheit aller Tumorzellen}}$$

Für den TPS-Score gibt es gemäß aktueller Studienlage etablierte Schwellwerte, welche im klinischen Alltag die Indikationsgrenze in der Erst- und Zweitlinientherapie von metastasierten oder rezidivierenden HNSCC festlegen. Für den Immun-Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab liegt dieser therapeutische Grenzwert zum Beispiel bei einem TPS-Score > 50% (Cohen, 2019).

Combined Positivity Score (CPS)

Der CPS-Score bezeichnet die Anzahl an PD-L1 gefärbten Zellen (Tumorzellen und Immunzellen), geteilt durch die Gesamtzahl an vitalen Tumorzellen (Schildhaus, 2018). Anschließend wird der Bruch mit 100 multipliziert. Der CPS-Score kann Werte zwischen 0 und 100 aufweisen und wird als Absolutwert angegeben.

$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1-positive Zellen (Tumorzellen, MICs)}}{\text{Gesamtheit aller Tumorzellen}} \times 100$$

Im Zähler werden nur PD-L1-gefärbte Tumorzellen, sowie Tumor-assoziierte Makrophagen und Lymphozyten berücksichtigt. Diese Makrophagen und Lymphozyten werden als mononukleäre inflammatorische Zellen (MIC) bezeichnet und nur dann inkludiert, wenn sie im Rahmen des Mikroskopierens bei der 20x Vergrößerung innerhalb des Tumors oder in dessen unmittelbarer Nachbarschaft liegen. Tumorzellen werden nur dann gezählt, wenn Sie eine membranständige (komplett oder inkomplett) PD-L1-Färbung aufweisen. Tumorzellen, welche ausschließlich eine zytoplasmatische Färbung aufweisen, werden vom „Scoring“ ausgeschlossen. Im Tumormilieu liegende Makrophagen und Lymphozyten werden sowohl bei zytoplasmatischer wie auch bei membranständiger Färbung inkludiert. Die Färbintensität wird bei beiden Zellarten nicht berücksichtigt. Andere gutartige Zellen und Strukturen (beispielsweise Fibroblasten, Nekrosen, Entzündungsherde, sowie Carcinoma in situ) werden beim CPS-Score nicht berücksichtigt. Auch für den CPS-Score gibt es gemäß aktueller Studienlage etablierte Schwellwerte, welche im klinischen Alltag die Indikationsgrenze in der Erst- und Zweitlinientherapie von metastasierten oder rezidivierenden HNSCC festlegen. Für den Immun-Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab liegt dieser therapeutische Grenzwert beispielsweise bei $\text{CPS} > 1$ (Cohen, 2019).

2.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit „R-Studio“, R-Version 4.0.3 (2020-10-10). Nach Erhebung und Import der Daten wurden diese in R-Skripten weiterverarbeitet.

Eine deskriptive Beschreibung der erhobenen Daten erfolgte durch die Ermittlung von Mittelwert, Streuung und Median. Eine entsprechende Visualisierung der Daten mittels eines Streudiagramms ist in Abbildung 4 dargestellt, in welchem der CPS-/TPS-Score sowie der Immunphänotyp aller gemessenen Einzelproben gezeigt ist. Boxplots dienten unter anderem zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen den „Scores“ und dem HPV-Status. Um den Grad der Übereinstimmung zwischen TPS- und CPS-Score zu bestimmen, wurden Scatterplots und Korrelationskoeffizienten angewandt. Letzterer beschreibt einen möglichen Zusammenhang zwischen zwei Zielgrößen (stetige Merkmale= Pearson-Korrelationskoeffizient). Dabei können die Koeffizienten Werte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei 1 die stärkste Korrelation bezeichnet (Röhrig, 2010). Für die Prüfung auf Normalverteilung der Daten, beispielsweise für die Betrachtung von Unterschieden in den beiden „Scores“ zwischen HPV-negativen und HPV-positiven Fällen, wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden für Vergleiche zwischen zwei Gruppen der t-Test und bei nicht-normalverteilten Daten der Mann-Whitney-Test (Wilcoxon) angewendet. Der Fisher-Exakt-Test diente im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter anderem zur Testung auf Unabhängigkeit von HPV-Status und Immunphänotyp.

Um prognostische Faktoren bezüglich des klinischen Endpunkts Rezidivfreiheit zu bestimmen, wurden die Daten in einen Trainings-Datensatz (= LMU-KKG-Kollektiv 2008-2013) und einen Validierungs-Datensatz (=LMU-KKG-Kollektiv 2013-2016) aufgeteilt. Es wurden verschiedene Schwellwerte im Trainings-Datensatz betrachtet und von diesen Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. Anschließend diente der Validierungs-Datensatz zur Überprüfung, ob der jeweilige Schwellwert in der Lage ist, zwei Gruppen mit unterschiedlichem Risiko bezüglich des Auftretens eines Rezidivs, signifikant voneinander zu trennen.

Da die HPV-positiven HNSCC prognostisch ein gänzlich anderes Risikoprofil aufweisen und in den Kollektiven dieser Dissertation nur eine vergleichsweise geringe Fallzahl HPV-positiver Fälle enthalten war, wurden die prognostischen Analysen auf die HPV-negativen Fälle beschränkt.

Kaplan Meier-Analyse

Die Kaplan-Meier-Analyse dient zur Schätzung zu einem bestimmten Zeitpunkt ohne Ereignis zu sein (sogenannte Überlebenswahrscheinlichkeit). Sämtliche Ereignisse werden hierzu nach ihrer Beobachtungsspanne sortiert. Es erfolgt zum Zeitpunkt eines jeden Ereignisses die Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeit (in Fall der vorliegenden Studie des Rezidivrisikos) für die Patienten, welche noch kein Ereignis hatten. Die geschätzte Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Ereignisses wird dabei als „Hazard Risk“ bezeichnet. Anschließend wird anhand der geschätzten Überlebenskurven geprüft, ob die Ereignisse in beiden Gruppen gleich verteilt sind oder ob es eine Differenz gibt, welche durch Zufallsmuster nicht erklärbar ist. Dieser Gruppenvergleich erfolgt mittels Log Rank-Test. Anfang und Ende der Beobachtungszeit werden vor der Analyse entsprechend festgelegt. Sofern bei einem Patienten das erwartete Ereignis (Auftreten eines Rezidivs) erst nach Studienende eintritt oder der Patient aus anderen Gründen vorzeitig aus der Studie ausscheidet, wird dieser Fall als „zensiert“ bezeichnet (Zwiener, 2011). In der Kaplan-Meier-Analyse wird auf der X-Achse die Überlebenszeit und auf der Y-Achse die kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit aufgetragen (Zwiener, 2011).

Die Kaplan-Meier-Analyse weist im Gegensatz zur logistischen Regression zwei Besonderheiten auf. Erstens eine zeitliche Komponente: ganz frühe und ganz späte Ereignisse sind sehr unwahrscheinlich, da das „Hazard Risk“ zumeist sein Maximum im mittleren Bereich der Überlebenskurve aufweist. Zweitens das Ausscheiden von Patienten aus der Kohorte, bevor das Ereignis eingetreten ist. (sogenannte Rechts-Zensierung) (Clark, 2003). Der Vorteil der Kaplan-Meier-Analyse liegt darin, dass Sie auch bei nicht identischen Beobachtungszeiträumen und bei am Ende der Beobachtung noch nicht eingetretenen Ereignissen angewandt werden kann. Eine Schätzung des Median-Follow-Up ist durch einen reversen Kaplan-Meier-Schätzer möglich. Hierbei wird die Zensierung zum Ereignis und entspricht somit der Zensierung. Die Kaplan-Meier-Analyse dient zur Visualisierung von Gruppenunterschieden, wohingegen der Log Rank-Test zur Testung auf Gruppenunterschiede verwendet wird. Um Aussagen zur Signifikanz treffen zu können, wurde der p-Wert verwendet, wobei p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet wurden.

Cox-Regression

Die Cox-Regression kann auch kontinuierliche Variablen, beziehungsweise multivariable Modelle berücksichtigen. Letzteres wurde in der vorliegenden Arbeit zum Beispiel bei der Erstellung des „Risk Score“ angewandt. Die Cox-Regression kann als univariablen oder multivariablen Analyseverfahren durchgeführt werden. Es lässt sich so der Einfluss einer oder mehrerer Variablen auf die Überlebenszeit analysieren und quantifizieren (Cox, 1972). Die Cox-Regression bietet die Möglichkeit, einen Schätzer für die Größe des Einflusses auf die Variable zu erhalten (sogenannte „Hazard Ratio“). Bei den verwendeten Cox-Modellen wurden die „Hazard Ratios“ als konstant angenommen. Diese Konstanz ist Voraussetzung für die Durchführung einer Cox-Regression. Bezüglich der „Odds Ratios“ (Quotenverhältnis), sowie im Zuge der Cox-Regressionsanalysen wurden 95%-Konfidenzintervalle verwendet.

In der vorliegenden Dissertation wurden signifikante Variablen ($p < 0,1$) in einer univariablen Cox-Regression in einem multivariablen Cox-Modell genauer betrachtet und dabei schrittweise nicht-signifikante Variablen entfernt („Backward Selection“, Abbildung 2), um am Ende eine Gesamtheit an Faktoren zu haben, die das Risiko bestimmen.

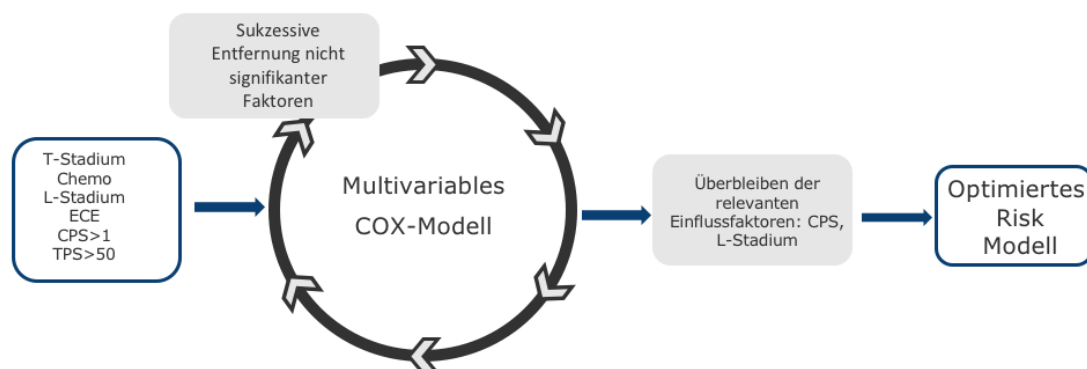


Abbildung 2: Darstellung der multivariablen Cox-Regression

Log Rank-Test

Damit die Kaplan-Meier-Kurven verschiedener Gruppen miteinander verglichen werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit der Log-Rank-Test mit einem Signifikanzniveau von $<0,05$ angewandt. Dieser Test untersucht, ob die Überlebenszeiten in den zu vergleichenden Gruppen gleich lang sind. Der Vergleich bezieht sich dabei auf den gesamten Beobachtungszeitraum und nicht auf einen bestimmten Zeitpunkt. Das „Hazard Ratio“ ist ein Quotient aus der Sterberate von zwei verschiedenen Gruppen und somit ein deskriptives Maß dafür, wie sich das Ereignisrisiko in der vergleichenden Gruppe zur Referenzgruppe verhält. Bei einem „Hazard Ratio“ von 1 ist das Risiko in beiden Gruppen gleich, bei > 1 ist es erhöht und bei < 1 erniedrigt (Zwiener, 2011). Die Genauigkeit der Schätzung wird über das Konfidenzintervall angegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin die prognostische Bedeutung einer heterogenen PD-L1-Expression bezüglich des klinischen Endpunktes Rezidivfreiheit untersucht. Dies geschah ebenfalls mithilfe von Kaplan-Meier-Analysen. Gruppenunterschiede zwischen homogenen und heterogenen Fällen wurden mittels univariabler und multivariabler Cox-Regression beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch die Heterogenität der PD-L-Expression untersucht. Da es keine klare Definition von „Heterogenität“ gibt, wurde ein Fall als heterogen bezeichnet, wenn die drei Stenzen um ein gewisses Maß voneinander abwichen. Als Bezugspunkt diente hierbei der Mittelwert der drei Stenzen. Wenn der maximale Abstand der drei Stenzen (sogenannte Spannweite) größer war als der Mittelwert, wurden diese Fälle bei kleinen Mittelwerten (Mittelwert < 50) als heterogen eingestuft. Bei großen Mittelwerten (> 50) entsprechend bei einer Spannweite, welche größer als 100-Mittelwert war.

Weiterhin wurde ein „Risk Score“ ermittelt, welcher die mittels-Cox-Regression ermittelten signifikanten Einflussfaktoren vereint. Zu diesen Einflussfaktoren gehören TPS- und CPS-Score, sowie die klinischen Faktoren Lymphgefäßinfiltration (L1) und extrakapsuläres Wachstum (ECE). Die Absicht bestand darin, eine Gruppe mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Rezidivs nach erfolgter Radio(chemo)therapie von einer Gruppe mit einem niedrigeren Rezidiv-Risiko abzugrenzen. Die Bestimmung des „Risk Score“ erfolgte durch Multiplikation der Cox-Koeffizienten mit den TPS- und CPS-Scores der einzelnen Fälle. Die durch diese individuelle Risikobewertungen gebildeten Risikogruppen wurden anschließend mittels Log Rank-Tests auf signifikante Unterschiede hinsichtlich des klinischen Endpunkt Rezidivfreiheit untersucht.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation sollte die PD-L1-Expression in HNSCC-Kollektiven unter Verwendung standardisierter Färbe- und Auswerteschemata systematisch untersucht und unter verschiedenen Aspekten ausgewertet werden. Wesentliche Aspekte waren dabei der Zusammenhang zwischen etablierten PD-L1-Scores (TPS, CPS) und Immunphänotypen, die Abhängigkeit der PD-L1-Expression vom HPV-Status, der prognostische Wert der PD-L1-Expression nach adjuvanter Radiochemotherapie, die Veränderung der PD-L1-Expression zwischen Primärtumoren und Rezidiven, sowie die Heterogenität der PD-L1-Expression innerhalb eines Tumors. Um diese Fragestellungen beantworten zu können, waren immunhistochemische Färbungen für PD-L1 und infiltrierende Immunzellen sowie umfangreiche statistische Analysen erforderlich.

3.1 Immunhistochemische Färbungen zur Bestimmung der PD-L1-Expression und von Immunphänotypen

Immunhistochemische Färbungen zur Bestimmung der PD-L1-Expression bekommen in der zunehmend personalisierten und zielgerichteten Therapie von metastasierten und rezidivierten HNSCC eine immer größere Bedeutung. Hierbei spielt die Immun-Checkpoint-Inhibition, auch bei der primären Therapie von HNSCC, eine immer größere Rolle. Mittels standardisierten immunhistochemischen Färbemethoden wurden FFPE-Proben von insgesamt 260 Fällen für PD-L1-Expression und CD3/CD8 Oberflächenmarker auf infiltrierenden Immunzellen gefärbt. Vornehmlich waren dies TMAs mit drei Tumorstanzen pro Fall und zu einem geringeren Anteil FFPE-Schnitte von einzelnen Fällen. Unter Anwendung definierter immunhistochemischer Färbekriterien erfolgte eine systematische Bestimmung der PD-L1-Expression mittels TPS- und CPS-Score (Abbildung 3A), sowie des Immunphänotyps über eine CD3-/CD8-Färbung infiltrierender Immunzellen (Abbildung 3B). Die Auswertung erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der LMU (Prof. Dr. Walz). Eine vorherige Auswertung von TPS-Score und Immunphänotyp war durch Herrn Prof. Dr. Walz bereits einmalig erfolgt. Ein Überblick über die detaillierteren „Scoring“-Ergebnisse ist in Tabelle 4 im Anhang dargestellt. Üblicherweise wird hierbei auf Grundlage dieser Tabelle ein Mittelwert bestimmt. Beim TPS-Score weisen hierbei 48% (n=125) der Fälle einen Mittelwert <20% (21% (n=54) <5%), 18% (n=47) zwischen 20-50%, 5% (n=13) zwischen 51-70% und 11% (n=27) zwischen 71-100% auf. 19% (n=48) waren nicht adäquat auswertbar. Für den CPS-Score ergibt sich folgende Verteilung der Mittelwerte: 40% (n=103) haben einen Mittelwert <20 (21% (n=54)<5), 22% (n=57) zwischen 20-50, 4% (n=11) zwischen 51-70 und 15% (n=39) zwischen 71-100. 19% (n=50) waren nicht adäquat auswertbar. Die charakteristischen Färbemuster von PD-L1 positiven Tumor- und Immunzellen sind in Abbildung 3A gezeigt. Dabei ist vor allem darauf zu achten, dass nur solche Tumorzellen in den „Score“ einfließen, welche ausschließlich ein membranständiges Färbemuster aufweisen. Bei den Immunzellen werden zusätzlich auch zytoplasmatische Färbemuster eingeschlossen. Anhand der immunhistochemischen CD3-/CD8-Färbung der Immunzellen konnten weiterhin vier verschiedene Immunphänotypen bestimmt und anhand histologischer Kriterien voneinander abgegrenzt werden (Abbildung 3B). In den Patientenkollektiven der vorliegenden Arbeit wiesen die Schnitte oder einzelnen Stanzen der untersuchten Fälle eine unterschiedlich hohe PD-L1-Expression auf. Beispiele für die unterschiedlich starken Färbemuster (entsprechend der ermittelten TPS- oder CPS-Scores) sind in Abbildung 3C abgebildet. HNSCC zeigen oftmals eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität, was möglicherweise eine prognostische Bedeutung hat. Das Vorliegen von TMAs erlaubte es in der vorliegenden Arbeit, die intratumorale Heterogenität der PD-L1-Expression anhand von drei Tumorstanzen pro Fall zu bestimmen. Auch innerhalb eines Gewebeschnitts können homogene und

heterogene Färbemuster auftreten. Ein Beispiel für ein homogenes und heterogenes PD-L1-Expressionsmuster ist in Abbildung 3E gezeigt.

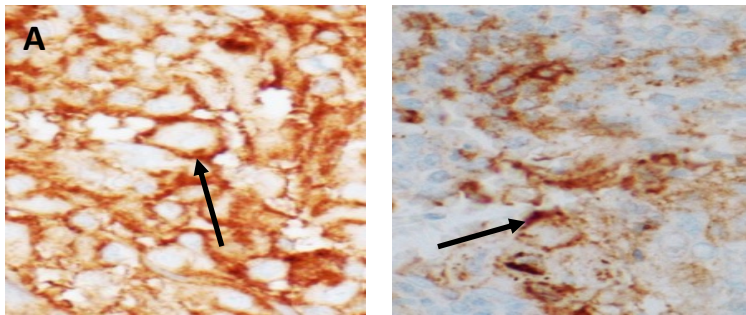


Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung von PD-L1 (Antikörper SP263) und CD3/CD8 positiven Immunzellen (Antikörper SP7 und C8-144B).

Die Fälle wurden mit 200facher Vergrößerung anhand der PD-L1 positiven Membranfärbung der Tumorzellen (=TPS-Score: gefärbte Tumorzellen/Gesamtzahl Tumorzellen) oder anhand der Summe gefärbter mononukleärer Immunzellen (Membran- und Zytoplasma-Färbung) und gefärbter Tumorzellen (=CPS-Score: gefärbte Tumorzellen+gefärbte Immunzellen/Gesamtzahl Tumorzellen x 100) klassifiziert. Die Immunphänotypen wurden anhand CD3/8-positiv gefärbter Immunzellen bestimmt und als „hot“ (starke Infiltration zytotoxischer Lymphozyten), „cold“ (keine Infiltration zytotoxischer Lymphozyten), „immunosuppressed“ (Infiltration zytotoxischer Lymphozyten ohne Interaktion mit Tumorzellen) und „excluded“ (zytotoxische Lymphozyten ohne Infiltration in das Tumorgewebe) klassifiziert.

3A: Beispiel für PD-L1 gefärbte Tumorzellen (links) und PD-L1 gefärbte Immunzellen (rechts) in Fall P104. Die Tumorzelle muss eine (partielle oder vollständige) membranständige Färbung (Pfeil) aufweisen, die Immunzellen dürfen membranständig und/oder zytoplasmatisch gefärbt sein (Pfeil).

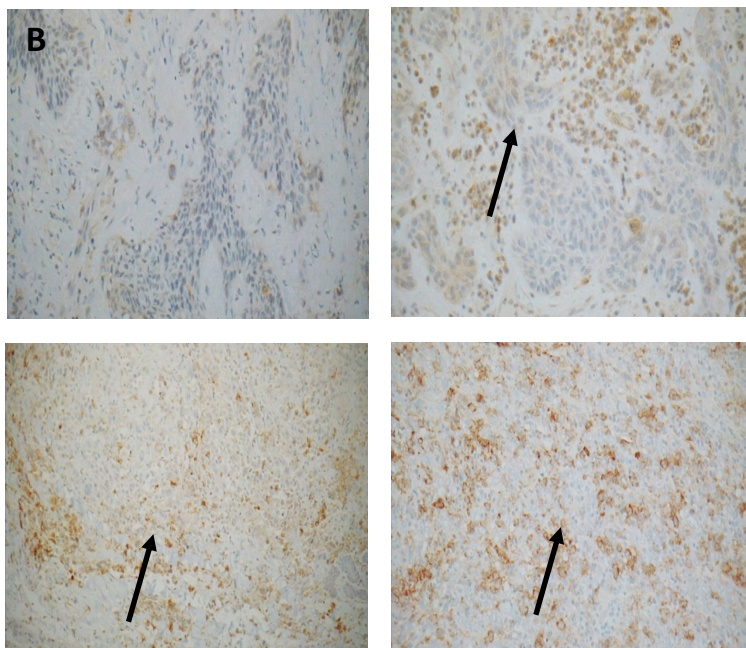


Abbildung 3B: Beispiele für Immunphänotypen. Die Pfeile markieren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Immunphänotypen, welche vor allem durch das Ausmaß der Infiltration durch zytotoxische Lymphozyten gekennzeichnet sind: links oben: „cold“ (keine Infiltration zytotoxischer Lymphozyten) in Fall P006, rechts oben: „excluded“ (zytotoxische Lymphozyten ohne Infiltration in das Tumorgewebe) in Fall P009, links unten: „immunosuppressed“ (Infiltration zytotoxischer Lymphozyten ohne Interaktion mit Tumorzellen) in Fall P015, rechts unten: „hot“ (starke Infiltration zytotoxischer Lymphozyten), in Fall P084.

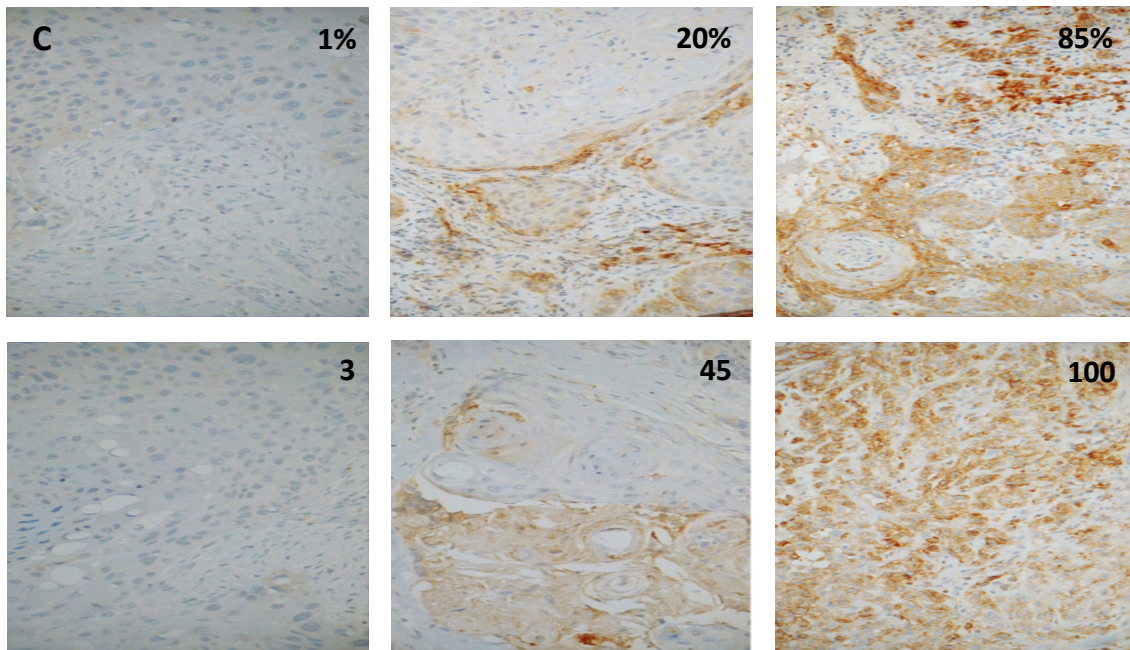


Abbildung 3C: Obere Reihe: Beispiele für PD-L1 Auswertung des TPS-Scores (links TPS=1%, Fall P113, Mitte TPS=20%, Fall P008, rechts TPS=85%, Fall P015, Untere Reihe: Beispiele für PD-L1-Auswertung der CPS-Score (links CPS=3, Fall P105, Mitte CPS=45, Fall P006, rechts CPS=100, Fall P015)

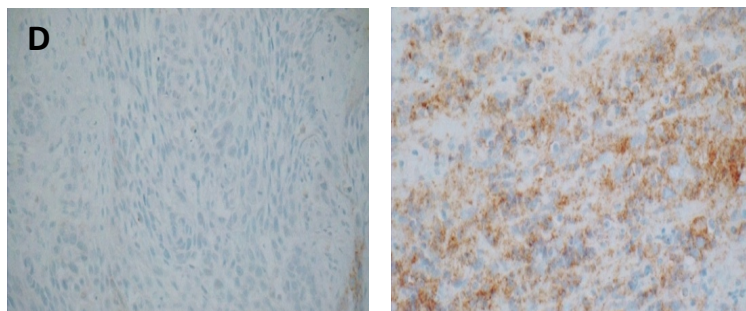


Abbildung 3D: links: Beispiel für einen HPV-negativen Tumor (Fall P077) mit geringer PD-L1-Expression (TPS=7%, CPS=18) und „cold“ Immunphänotyp, rechts: Beispiel für einen HPV-positiven-Tumor (Fall P244) mit starker PD-L1-Expression (TPS=88%, CPS=93) und „hot“ Immunphänotyp.

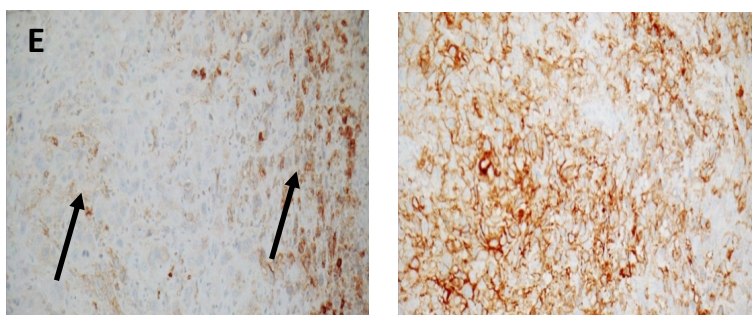


Abbildung 3E: Links: Beispiel für eine heterogene PD-L1-Expression (TPS und CPS heterogen) eines HPV-negativen Tumors (Fall P008), rechts: Beispiel für homogene PD-L1-Expression (TPS und CPS homogen) eines HPV- Tumors (Fall P036).

Bei der statistischen Auswertung der systematisch erhobenen TPS-/CPS-Scores sowie des Immunphänotyps zeigte sich eine enge Verknüpfung zwischen TPS- und CPS-Score (Pearson-Korrelationskoeffizient 0,92), sowie des Immunphänotyps. Auffällig war, dass niedrige TPS- und CPS-Scores (<20% bzw. <20) zumeist den Immunphänotyp „cold“ aufwiesen (Abbildung 4). So zeigten Tumoren mit dem Immunphänotyp „cold“ in unseren Daten einen Mittelwert von 9,8% im TPS-Score und 15,4 im CPS-Score. Umgekehrt war der Immunphänotyp „hot“ vor allem mit hohen „Scores“ und hier vor allem mit „Score“-Werten über 80 beziehungsweise über 80 korreliert (Abbildung 4). Von den 14 Fällen mit dem Immunphänotyp „hot“ zeigten 64,3% (n=9) einen TPS-Score >50% (p-Wert=0,4) und 85,7% (n=12) einen CPS-Score >50 (P-Wert=0,01). Wie aus der Häufigkeitsverteilung der Immunphänotypen in den beiden Scores in Abbildung 4 deutlich wird, korrelierte insbesondere ein hoher CPS-Score mit dem Immunphänotyp „hot“, weil im CPS-Score zusätzlich infiltrierende Immunzellen berücksichtigt werden.

Der mittlere „Score“-Bereich für die PD-L1-Expression (20-80% beziehungsweise 20-80) ist vorzugsweise mit den beiden Immunphänotypen „immunosuppressed“ und „excluded“ verknüpft (Mittelwerte: „immunosuppressed“: TPS-Score: 29%, CPS-Score: 37; „excluded“: TPS-Score: 22%, CPS-Score: 32).

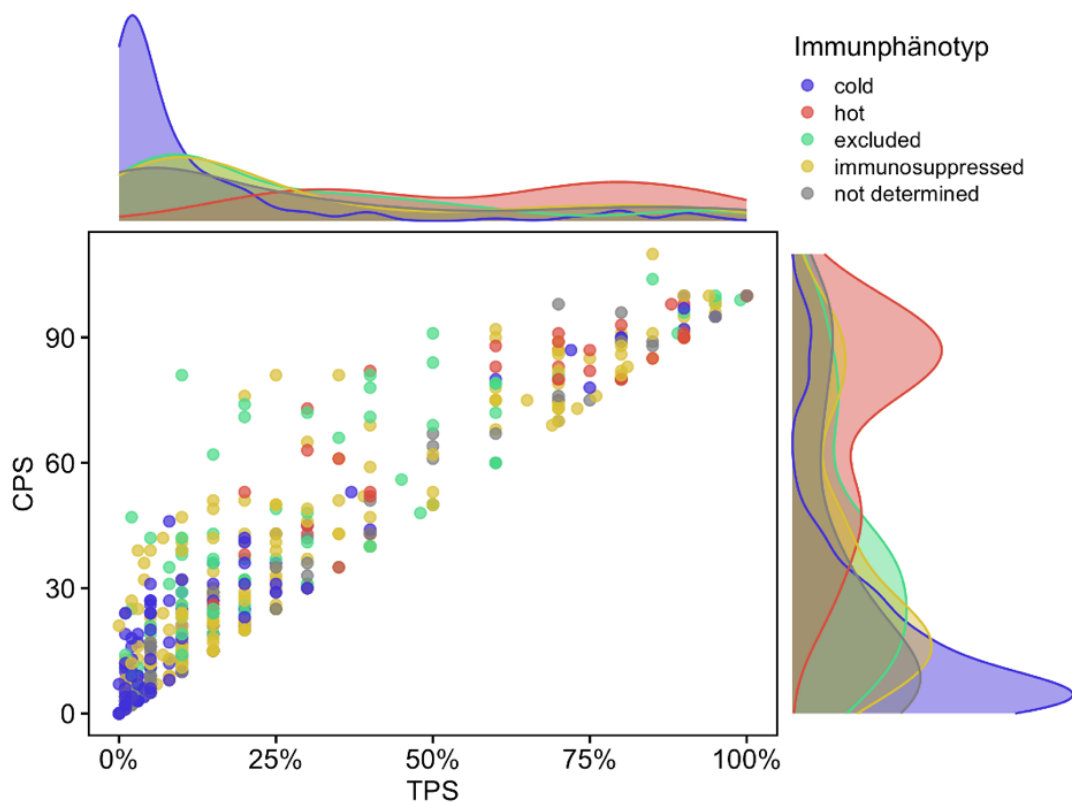


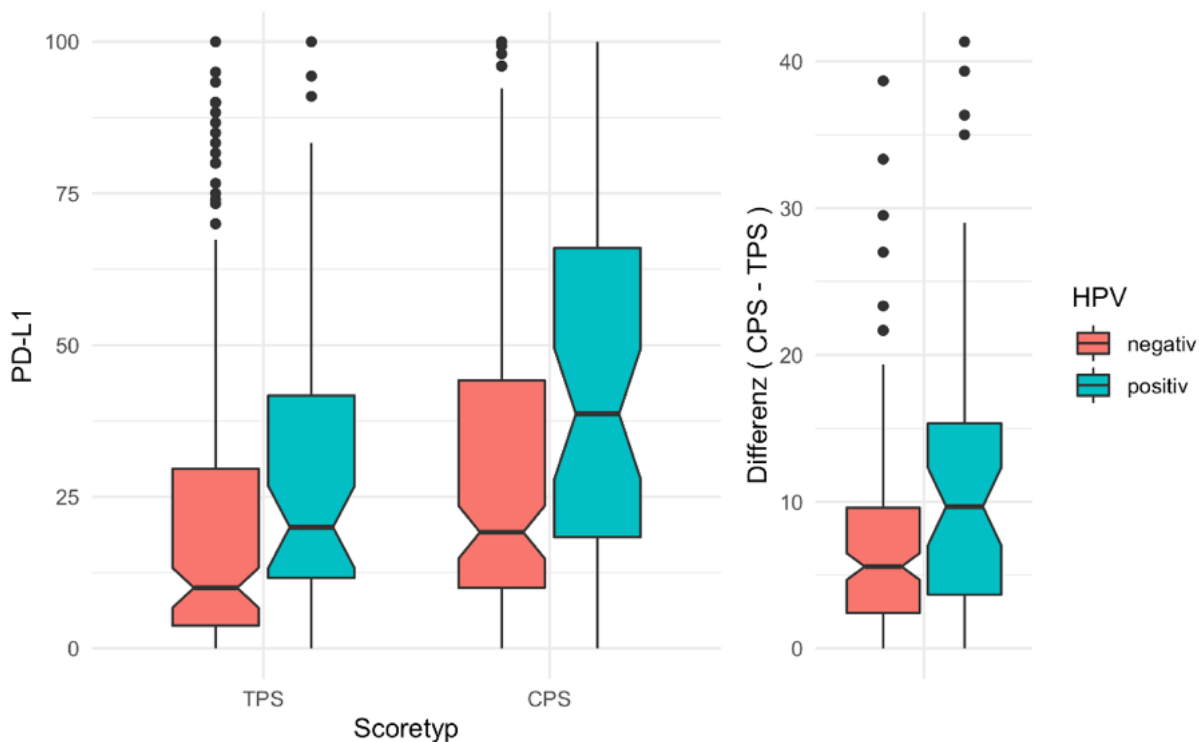
Abbildung 4: Streudiagramm für alle gemessenen Tumor Proben (TPS-Score: X-Achse in %, CPS-Score: Y-Achse als Absolutwert).

Verteilung der beiden Variablen (TPS, CPS) in allen Tumorproben (Stanzen, Schnitte von Primär- und Rezidivtumoren). Es wird deutlich, dass TPS- und CPS-Werte eng miteinander verknüpft sind. Zusätzlich sind in der Darstellung auch die verschiedenen Immunphänotypen (Infiltration der Tumoren mit CD3- und CD8-positiven zytotoxischen Lymphozyten) den einzelnen Tumorproben zugeordnet (Immunphänotyp blau: „cold“, keine Infiltration; rot: „hot“, starke Immunzellinfiltration; grau: „excluded“, Immunzellen vorhanden, aber keine Infiltration; gelb: „immunosuppressed“, Infiltration, aber keine Interaktion mit Tumorzellen). Das Streudiagramm ist dazu mit einer Häufigkeitsverteilung der Immunphänotypen auf X- und Y-Achse kombiniert, um die zum Teil überlagernden Messpunkte besser aufzulösen.

Es wird deutlich, dass Tumoren mit „cold“ Phänotyp überwiegend sehr niedrige TPS- und CPS-Werte (bis 20% bzw. 20) aufweisen (blauer Kurvenanteil), umgekehrt Tumoren mit „hot“ Phänotyp überwiegend hohe TPS- und insbesondere CPS-Werte (größer 80%, roter Kurvenanteil) aufweisen. Die Tumore mit mittleren TPS- und CPS-Werten (20-80 % bzw. 20-80) sind überwiegend den „immunosuppressed“ und „excluded“ Phänotypen, die auch als „altered“ Phänotyp zusammengefasst werden können, zugeordnet.

3.2 Die PD-L1-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status bei HNSCC

HPV-positive HNSCC stellen sowohl tumorbiologisch wie auch pathologisch aufgrund ihrer unterschiedlichen Prognose eine eigene Tumorentität dar. Deswegen ist eine separate Betrachtung des HPV-Status in Zusammenhang mit der PD-L1-Expression von zentraler Bedeutung. Die Bestimmung des HPV-Status erfolgte für alle Tumorkollektive mittels zweier komplementärer Methoden: der p16^{ink4a}-Immunfärbung und dem HPV-DNA-Nachweis mittels real-time-PCR zum Ausschluss falsch-positiver p16-Färbungen (Nauta, 2018) (siehe Material und Methoden 2.2.3). Diese Analysen erfolgten in Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München (Frau Dr. Heß-Rieger). Insgesamt wurde bei den 240 Fällen der Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und dem HPV-Status genauer betrachtet. 54 (23%) der Fälle waren HPV-positiv und 186 (77%) HPV-negativ. Es zeigten sich höhere TPS- und CPS-Scores bei den HPV-positiven im Vergleich zu den HPV-negativen Fällen (Abbildung 5). Besonders deutlich unterschied hierbei der CPS-Score die HPV-positiven von den HPV-negativen Fällen. Es zeigte sich, dass vor allem der Anteil PD-L1 exprimierender Immunzellen in HPV-positiven Fällen deutlich erhöht ist (Differenz CPS-TPS Score, Abbildung 5). Dies geht einher mit einem vermehrten Auftreten von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) im Tumormikromilieu HPV-positiver Karzinome (Partlova, 2015) und spiegelt sich auch wieder in den überrepräsentierten „hot“ Immunphänotypen in HPV-positiven Tumoren der untersuchten Tumorkollektive.



HPV	„cold“	„excluded“	„immunosuppressed“	„hot“
negativ	48	25	63	10
positiv	13	7	20	3

Abbildung 5: PD-L1- Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status in den untersuchten HNSCC-Tumorkollektiven.

Die Abhängigkeit des „Tumor Proportion Score“ (TPS) und „Combined Positivity Score“ (CPS) vom HPV-Status der Patienten ist in dieser Abbildung dargestellt. Links und mittig sind in den Boxplots die Mediane (schwarze Linien) und die Verteilung von TPS- und CPS-Werten in HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC dargestellt. Die HPV-positiven Fälle zeigen auch hier, sowohl für CPS- als auch für TPS-Werte, höhere Mediane. Die CPS-Mediane zeigen dabei den deutlichsten Unterschied zwischen HPV-positiven und -negativen Fällen. Mittels Wilcoxon-Tests wurde auf Gleichheit von Verteilungen getestet (TPS: HPV-positiv gegen HPV-negativ: $W=2792$, $p=0.006$; CPS: HPV-positiv gegen HPV-negativ: $W=2640$, $p=0.002$ und für die Differenz HPV-positiv gegen HPV-negativ: $W = 2860$, $p = 0.007$). Die rechten Boxplots zeigen den Unterschied der CPS-TPS-Differenz zwischen den HPV-positiven und -negativen Fällen. Es zeigen sich im Vergleich zu den HPV-negativen Fällen höhere Mediane in der Gruppe der HPV-positiven Fälle.

Unten: Kreuztabelle Immunsubtyp und HPV-Status: Bei der Testung mit Fisher's- Exakt-Test auf Unabhängigkeit zwischen dem Immuntyp und HPV-Status ergab sich ein p-Wert von 0.001. Bei Betrachtung nur für „hot“ und „cold“ Immunphänotypen, war ein signifikanter Unterschied bezüglich des HPV-Status zu beobachten. Unter den Fällen mit dem Immunphänotyp „cold“ überwiegen im Gegensatz zu dem Immunphänotyp „hot“ deutlich die HPV-negativen Fälle (Fisher-Exakt-Test $p < 0.001$, Odds Ratio 11.5(2.34, 63.7).

3.3 Die prognostische Bedeutung der PD-L1-Expression in HNSCC nach adjuvanter Radiochemotherapie

In der klinischen Routine wird bislang nur der HPV-Status zur Prognose des Krankheitsverlaufs verwendet. Die PD-L1-Expression dient hingegen zur Prädiktion einer Immun-Checkpoint-Inhibitor-Therapie (Mages, 2021). Hierbei wird bei HNSCC aktuell ein Schwellwert für eine Therapie mit Pembrolizumab von $>50\%$ für den TPS-Score und >1 für den CPS-Score angewendet (Burtness, 2019). Zum prognostischen Wert der PD-L1-Expression in HNSCC bei adjuvanter Radiochemotherapie gibt es in der Literatur allerdings widersprüchliche Ergebnisse. Deshalb wurde vor dem Hintergrund dieser publizierten Erkenntnisse in der vorliegenden Arbeit die Frage gestellt, inwiefern die PD-L1-Expression ein prognostisch relevanter Faktor für das Auftreten eines Rezidivs nach erfolgter Radiochemotherapie ist. Hierzu wurden die beiden größten HNSCC-Kollektive zunächst in einen „Discovery“ Datensatz (KKG-Kollektiv 2008-2013) und einen Validierungs-Datensatz (KKG-Kollektiv 2013-2016) aufgeteilt. Da die HPV-positiven HNSCC ein gänzlich anderes prognostisches Risikoprofil aufweisen, wurden die prognostischen Analysen auf die HPV-negativen Fälle beschränkt. Zur Ermittlung optimaler prognostischer TPS-/CPS-Schwellwerte wurden im „Discovery“- Datensatz Kaplan-Meier-Kurven unter Verwendung eines Cox-Regression-Modells für eine Vielzahl von TPS-/CPS-Schwellwerten ermittelt und mittels Log-Rank-Test miteinander verglichen. Die Schwellwerte mit den kleinsten p-Werten aus dem Log-Rank-Test trennen das untersuchte Kollektiv signifikant in eine Hochrisiko- und eine Niedrigrisiko-Gruppe im Hinblick auf das Auftreten eines Rezidivs nach adjuvanter Radiochemotherapie auf. In Abbildung 6A wurden die \log_{10} -Werte der ermittelten p-Werte für TPS- und CPS-Scores aufgetragen. Sehr kleine p-Werte $<0,05$ ergaben sich für sehr niedrige „Scores“ (TPS $<1\%$, CPS <1), eine Abnahme der p-Werte war nochmals bei TPS=45% und CPS=25 zu beobachten, die sehr nahe an den prädiktiven therapeutischen Schwellwerten von TPS=50% und CPS=20 liegen.

Ergebnisse

Um die prognostische Relevanz der Schwellwerte TPS<1% und 45% sowie CPS<1 und 25 bezüglich des klinischen Endpunkts Rezidivfreiheit weiter zu untersuchen, wurden die vier Schwellwerte im Validierungs-Datensatz mittels Kaplan-Meier-Analysen und Log-Rank-Test überprüft. Hier konnten die Schwellwerte 1% für den TPS -Score und 1 für den CPS-Score als statistisch signifikant validiert werden (Abbildung 6B). Die Schwellwerte von TPS=45% und CPS=25 zeigten keine signifikante Auftrennung von zwei Risikogruppen (Abbildung 6B). Auf Basis dieser univariablen Analysen wurden die nachfolgenden multivariablen Analysen zur prognostischen Relevanz der PD-L1-Expression und PD-L1-Heterogenität mit den Schwellwerten TPS/CPS<1 und TPS=50% durchgeführt, die den therapeutisch verwendeten Schwellwerten entsprechen und im „Discovery“-Datensatz der vorliegenden Arbeit abgebildet waren.

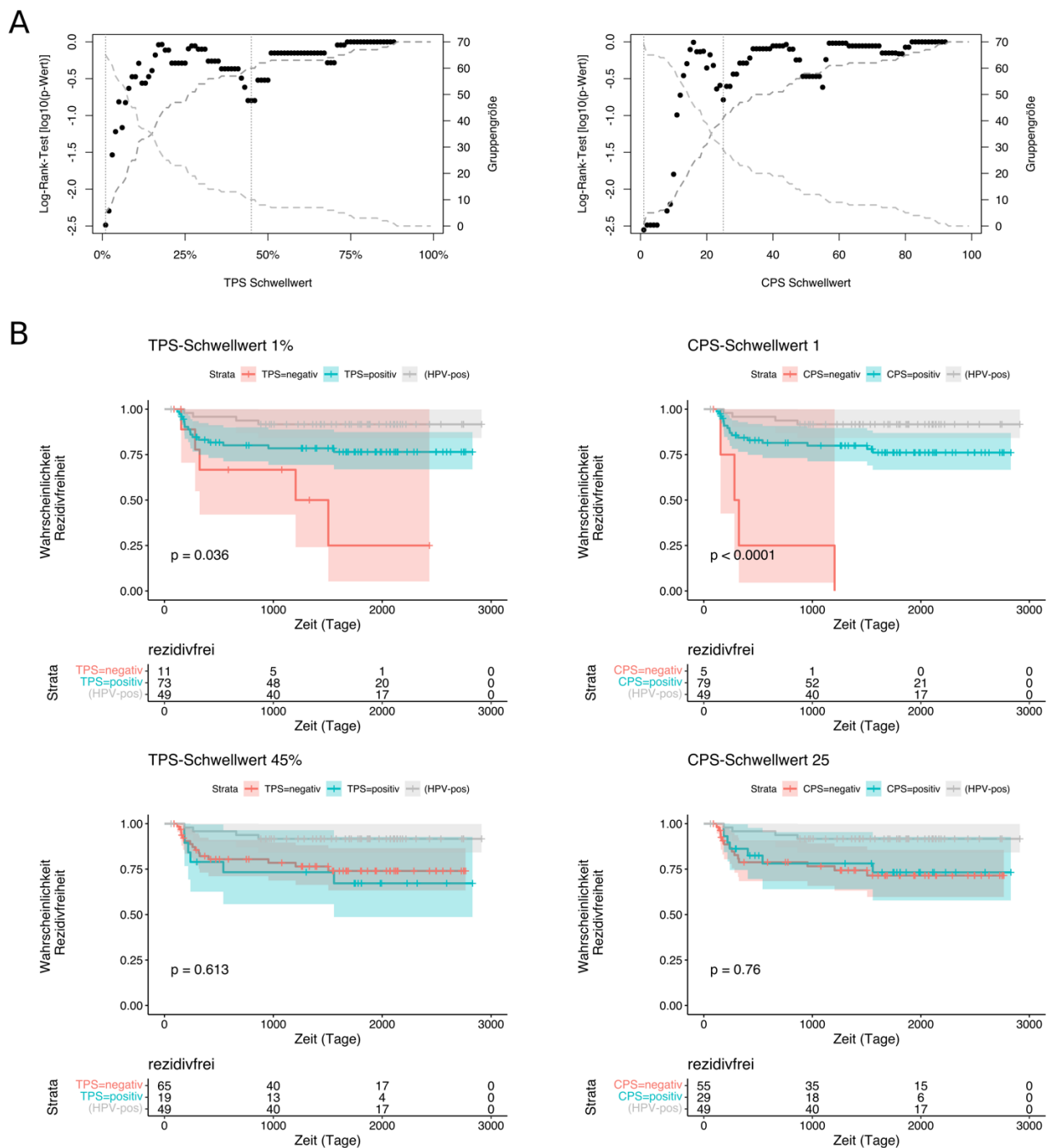


Abbildung 6: Prognostischer Wert der PD-L1-Expression in den HNSCC-Tumorkollektiven.

Für die Bewertung der PD-L1-Expression in Tumoren als prognostischer Parameter wurde als klinischer Endpunkt Rezidivfreiheit nach Strahlenchemotherapie gewählt. Es wurden verschiedene Schwellwerte für TPS- und CPS-Scores im KKG-Kollektiv 2008-2013 (HPV-negative Tumore) betrachtet und einer Kaplan-Meier Analyse unter Verwendung eines Cox-Regression Modells unterworfen. Die sich ergebenden Kaplan-Meier Kurven für jeden betrachteten Schwellwert wurden mithilfe des Log-Rank-Tests miteinander verglichen.

A: links: P-Werte (Y-Achse: log₁₀ der p-Werte) aus den Log-Rank-Tests für verschiedene TPS-Schwellwerte (X-Achse) des Kollektivs 2008-2013. Es ergibt sich ein optimaler Schwellwert von TPS=1% mit p<0,05. Allerdings ist bei den erhaltenen p-Werten auch ein lokales Minimum bei 45%, also nahe des therapeutischen Schwellwertes von TPS=50% zu erkennen. **Rechts:** p-Werte (Y-Achse: log₁₀ der p-Werte) aus den Log-Rank-Tests für verschiedene CPS-Schwellwerte (X-Achse) des Kollektivs 2008-2013. Es ergibt sich ein optimaler Schwellwert von CPS =1 mit p<0,05. Dieser CPS-Schwellwert stellt auch gleichzeitig den üblicherweise verwendeten therapeutischen Schwellwert dar. Darüber hinaus ist auch ein lokales Minimum bei den erhaltenen p-Werten im Bereich von CPS=25 zu erkennen.

B: zeigt unter Verwendung der Schwellwerte TPS=1% (links oben), TPS=45% (links unten), sowie CPS=1 (rechts oben) und CPS=25 (rechts unten) die Kaplan-Meier-Analysen für das Validierungs-Kollektiv (2013-2016). Für den TPS-Score zeigt der Schwellwert von 1% einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Patientengruppen (rote und blaue Kurve) hinsichtlich der Rezidivfreiheit nach Strahlenchemotherapie (p-Wert=0,036). Für den CPS-Score zeigt der Schwellwert 1 eine Patientengruppe (rote Kurve) mit einem signifikant höheren Risiko für die Entwicklung eines Rezidivs nach Strahlenchemotherapie (p-Wert<0,0001).

Sowohl für den TPS -Schwellwert von 45% als auch den CPS-Schwellwert von 25 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen (rote und blaue Kurve) hinsichtlich der Rezidivfreiheit nach Strahlenchemotherapie (TPS: p-Wert=0,61, CPS: p-Wert=0,76).

Als Referenz ist auch die Gruppe der HPV-positiven Patienten dargestellt (graue Kurve).

In einem nächsten Schritt wurde versucht, die mittels Cox-Regression ermittelten signifikanten Einflussfaktoren in einem „Risk Score“ zu vereinen, welcher durch Multiplikation der Koeffizienten aus den Cox-Regressionsmodellen für prognostische Parameter des „Discovery“- Kollektivs erzeugt wurde. Dabei wurde TPS-/CPS-Score als kontinuierliche Variable (Abbildung 7A), sowie zusätzlich der Einfluss von T-Stadium und extrakapsulärem Wachstum (Abbildung 7B) berücksichtigt und anhand des Validierungs-Datensatzes auf Ihre prognostische Relevanz überprüft. Mit diesem multivariablen Ansatz konnten in beiden Modellen (Abbildung 7 A, B) zwei Gruppen definiert werden, welche sich in Ihrem Rezidivrisiko signifikant voneinander unterscheiden (A: p-Wert: 0,014, B: p-Wert: 0,042).

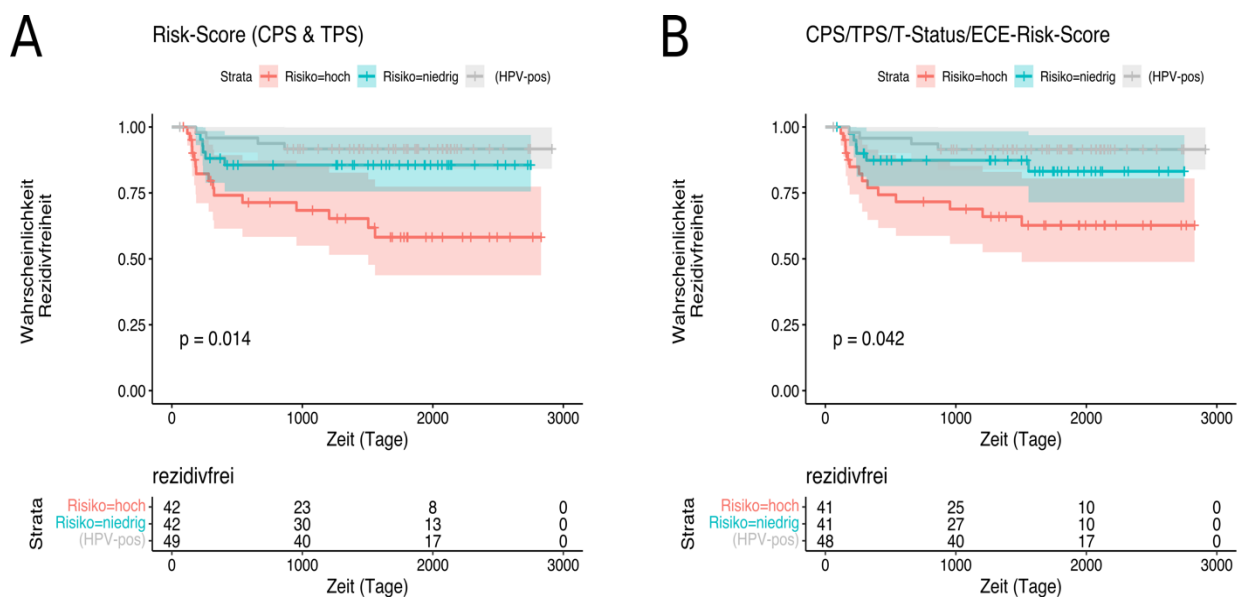


Abbildung 7: Prognostische Analyse mittels „Risk Score“

Kaplan-Meier Analysen unter Verwendung der Parameter Tumorstadium(T), extrakapsulärem Wachstum (ECE), sowie TPS- und CPS-Scores als kontinuierliche Variable (ohne Schwellwerte) im Kollektiv 2013-2016 (Validierungs-Kollektiv). Es wurden jeweils „Risk Scores“ gebildet, welche durch Multiplikation der Koeffizienten aus den Cox-Regressionsmodellen für prognostische Parameter des „Discovery“ Kollektivs erzeugt wurden.

A: Kaplan-Meier-Analyse des Validierungs-Kollektivs für den klinischen Endpunkt Rezidivfreiheit unter Verwendung eines „Risk Scores“ bestehend aus TPS und CPS, für den TPS- und CPS-Werte als kontinuierliche Variablen (ohne Schwellwerte) verwendet wurden. Die beiden sich ergebenden Patientengruppen wurden mittels Log-Rank-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Dabei zeigte sich ein signifikant höheres Risiko für die Entstehung von Rezidiven nach adjuvanter Radiochemotherapie in einer Patientengruppe (rote Linie, p-Wert=0,014).

B: Kaplan-Meier-Analyse des Validierungs-Kollektivs für den klinischen Endpunkt Rezidivfreiheit. Hier wurde ein „Risk Score“ bestehend aus TPS und CPS als kontinuierliche Variable (keine Schwellwerte), sowie Tumorstadium(T) und extrakapsulärem Wachstums (ECE) bestimmt. TPS- und CPS-Score wurden dabei als kontinuierliche Variablen zusammen mit den kategorialen Variablen T-Stadium und ECE verwendet. TPS- und CPS-Score sind dabei nicht unabhängig in den „Score“ eingegangen, es wurde vielmehr die Interaktion zwischen TPS- und CPS-Score genutzt(CPS-Score als Mittelwert und das Produkt von TPS- und CPS-Score). Hier konnte ebenfalls eine Gruppe mit einem signifikant erhöhten Risiko für die Entstehung eines Rezidivs nach erfolgter Radiochemotherapie detektiert werden(rote Linie, p-Wert=0,042).

Eine prognostische Bedeutung der PD-L1-Expression für die Entstehung von Tumorrezidiven nach adjuvanter Radiochemotherapie konnte somit für eine kleine Subgruppe von Patienten mit sehr niedriger PD-L1-Expression gezeigt werden. Für eine hohe PD-L1-Expression konnte ein prognostischer Wert hingegen mit keinem der beiden „Scores“ belegt werden (siehe Abbildung 7). Allerdings kann durch die Interaktion von TPS- und CPS-Scores und in Verbindung mit etablierten klinischen prognostischen Parametern eine prognostisch ungünstige Subgruppe identifiziert werden, die einer weiteren unabhängigen Validierung unterzogen werden sollte.

3.4 Heterogenität der PD-L1-Expression in HNSCC

HNSCC weisen oftmals eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität auf. Dies erschwert die Festlegung von therapeutischen Schwellwerten von TPS- und CPS-Score (Rasmussen, 2019) und wird mit erhöhter Therapieresistenz und folglich auch schlechterer Prognose in Verbindung gebracht. Deshalb sollte der Aspekt der Heterogenität der PD-L1-Expression auch in dieser Dissertation näher betrachtet werden.

Zur Bestimmung der Heterogenität für die PD-L1-Expression wurden einerseits die drei Tumorstanzen eines jeden Falls auf den TMA's der Patientenkollektive 2008-2013 und 2013-2016 betrachtet. Andererseits wurden von einer Subgruppe von 18 Fällen mit entweder homogener oder heterogener PD-L1-Expression auf den TMA's zusätzlich komplette FFPE-Schnitte der ausgewählten Fälle nochmals mit dem Anti-PD-L1-Antikörper gefärbt und nach den standardisierten TPS- und CPS-Kriterien ausgewertet, um zu bestimmen, ob dieselbe Klassifikation (homogen versus heterogen) auch unter Betrachtung des kompletten Tumorschnitts bestätigt werden kann (Patienten-ID: P045, P047, P048, P053*, P072, P075, P077, P084, P089, P090, P093*, P101, P102, P104, P126, P127, P146, P147. Zwei Fälle (*) wurden sowohl für den TPS- als auch für den CPS-Score berücksichtigt. Für die initiale Heterogenitäts-Analyse von den TMA's wurden nur Fälle mit drei auswertbaren Tumorstanzen pro Fall berücksichtigt (n=157), da eine Kategorisierung auf Grundlage einer unterschiedlichen Anzahl von Stanzen nicht vergleichbar gewesen wäre. Für die nachfolgende Auswertung wurden zudem beide Kollektive (KKG 2008-2016) zusammen betrachtet, da bei vorheriger Auftrennung in „Discovery“- und Validierungs-Datensatz die statistische „Power“ zu gering gewesen wäre, um mögliche Zusammenhänge mit einer prognostischen Bedeutung herauszuarbeiten.

In Abbildung 8A sind alle ermittelten TPS- und CPS-Scores für jede Tumorstanze von den TMAs zusammengefasst. Eine Heterogenität in der PD-L1-Expression wurde auf Grundlage der ermittelten „Scores“ definiert, wenn der maximale Abstand der ermittelten Werte für die drei Stanzen größer war als der Mittelwert. Alle Fälle, die in Abbildung 8A oberhalb des blauen Dreiecks liegen, wurden nach diesem Kriterium als heterogen, alle Fälle unterhalb dieses blauen Dreiecks als homogen klassifiziert. Von den eingeschlossenen n=157 Fällen waren für den TPS-Score n= 60 (38%) als heterogen und n=97 (62%) als homogen, sowie für den CPS-Score n=61 (39%) als heterogen und n= 96 (61%) als homogen klassifiziert (Abbildung 8B). In Abbildung 8B ist der Zusammenhang zwischen TPS- und CPS-Heterogenität, sowie des HPV-Status abgebildet. Dabei wird die Zusammenhangsstärke durch die „Odds Ratio“ abgebildet, dessen Referenzwert 1 ist.

Aus der oberen Kontingenztafel wird ersichtlich, dass bei Vorliegen von Homogenität im CPS-Score, die Chance für das Vorliegen von TPS-Homogenität um den Faktor 6,2 erhöht ist („Odds Ratio“ 6,2). Bezüglich der Heterogenität der PD-L1-Expression gibt es keinen (oder nur einen sehr schwachen) Unterschied zwischen HPV+ und HPV- für den CPS-Score (Abbildung 8B unten, „Odds Ratio“ 0,77, Konfidenzintervall [0.33, 1.75], p-Wert nach Fishers-Exakt-Test 0,6). Es gibt jedoch einen Unterschied für den TPS-Score, da hier unter den HPV-Positiven mehr homogene Fälle existieren (Abbildung 8B mittig, „Odds Ratio“ 0,42, Konfidenzintervall [0.16, 1.00], p-Wert nach Fisher- Exakt-Test 0,04).

Um die Definition der Heterogenität von den TMA-Stanzen zu überprüfen, wurden 18 Fälle, welche nach unserer statistischen Heterogenitäts-Definition(siehe Abschnitt 2.4) als besonders homogen beziehungsweise heterogen eingestuft wurden, nochmals von einem Pathologen (Prof. Dr. Walz) am Gesamtschnitt überprüft. Dabei wurde der Gesamtschnitt in Quadranten unterteilt und nach der im Manual des „Targos Pathologist Training“ beschriebenen Anleitung hinsichtlich der PD-L1-Heterogenität ausgewertet (agilent.com, 2019). Hierbei ergab sich mit Ausnahme eines Falls eine übereinstimmende Auswertung bezüglich der PD-L1-Heterogenität zwischen TMA-Stanzen und Gesamtschnitt.

TPS hom	CPS hom	TPS het	CPS het	NK
P072	P075	P045	P047	P104
P084	P089	P053*	P048	
P093*	P093*	P090	P053*	
P102	P101	P126	P072	
P146	P104		P127	
P147				

Tabelle 2: Heterogenitätsvergleich TMA/Gesamtschnitt (hom= homogen, het= heterogen, NK= Non-Konkordanz zwischen TMA und Gesamtschnitt)
 *= Fälle, die sowohl für den TPS- wie auch CPS-Score berücksichtigt wurden

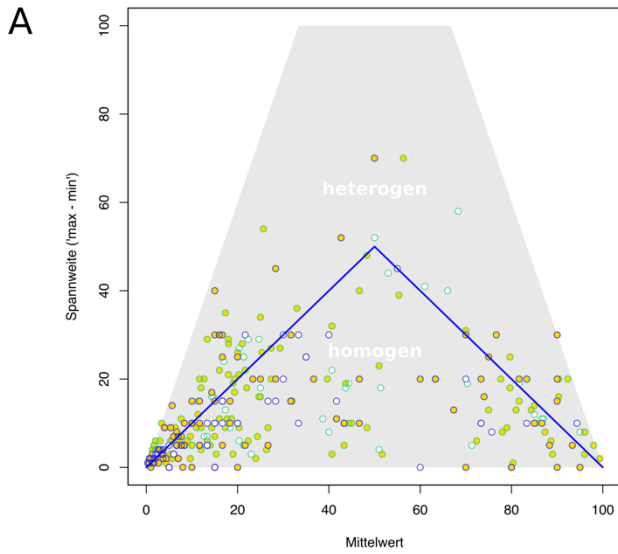
Um eine mögliche prognostische Relevanz der PD-L1-Heterogenität in TPS- und CPS-Score zu untersuchen, wurde zunächst eine univariable Analyse mittels Cox-Regression durchgeführt. Für den Parameter „Heterogenität der PD-L1-Expression“ zeigte sich für HPV-negative Fälle in der Kaplan-Meier-Analyse weder für den TPS- noch für CPS-Score eine signifikante Aufteilung in zwei Risikogruppen bezüglich des klinischen Endpunkts Rezidivfreiheit nach Radio(chemo)therapie (p-Wert jeweils > 0,05; Abbildung 8C).

Zusätzlich wurde die Heterogenität der PD-L1-Expression in Verbindung mit weiteren Parametern getestet. Für den TPS-Score konnte eine Subgruppe von HPV-negativen Tumoren identifiziert werden, die ein erhöhtes Risiko für ein Tumorrezidiv aufwies, wenn der TPS-Score entweder heterogen war oder einen Wert $>50\%$ aufwies (p-Wert: 0,015; Abbildung 8D).

Anhand des Gesamtdatensatzes wurde mittels „Backward Selection“ geprüft, welches die am besten erklären Variablen sind, wobei als prognostisch negative Faktoren schließlich TPS-Heterogenität und der L-Status übrigblieben. Dies hat zur Folge, dass der p-Wert deutlich überschätzt wird, da er das Ergebnis der durchgeführten „Backward Selection“ ist (p-Wert: 0,00085; Abbildung 8D).

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte somit aus dem Gesamtdatensatz die Hypothese formuliert werden, dass eine heterogene PD-L1-Expression in den Tumorzellen (TPS-Score) eine Auswirkung auf den Therapieerfolg bei einer adjuvanten Radiochemotherapie hat, wenn sie in Verbindung mit einer hohen PD-L1-Expression (TPS-Score $>50\%$) oder einem positiven L-Status auftritt. Eine heterogene PD-L1-Expression in Verbindung mit den infiltrierenden Immunzellen (CPS-Score) hat hingegen keine prognostische Bedeutung nach einer adjuvanten Radio(chemo)therapie. Dieser prognostische Zusammenhang zwischen Heterogenität der PD-L1-Expression und Rezidivfreiheit nach adjuvanter Radiochemotherapie müsste in einem unabhängigen Patientenkollektiv validiert werden.

Ergebnisse



B

		CPS		
		homogen	heterogen	
TPS	homogen	75	22	97
	heterogen	21	39	60
OR: 6.2 [2.9; 13.8]		96	61	157

		HPV		
		negativ	positiv	
TPS	homogen	68	29	97
	heterogen	51	9	60
OR: 0.42 [0.16; 1.00]		119	38	157

		HPV		
		negativ	positiv	
CPS	homogen	71	25	96
	heterogen	48	13	61
OR: 0.77 [0.33; 1.75]		119	38	157

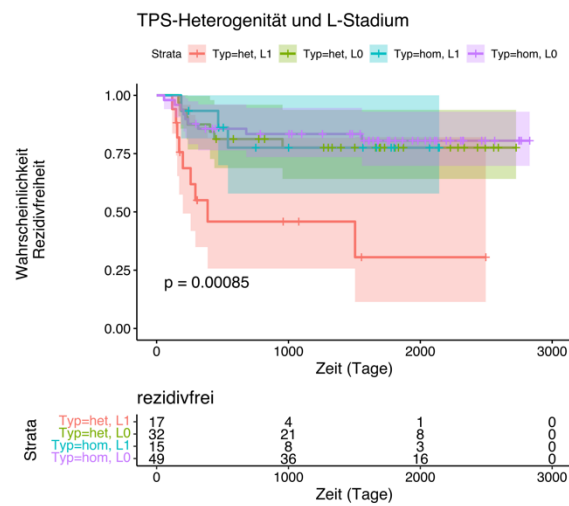
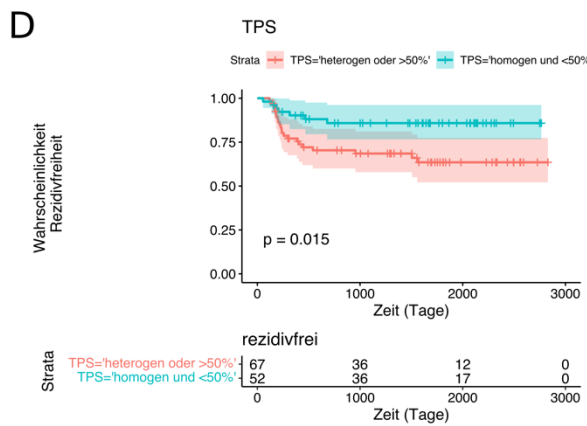
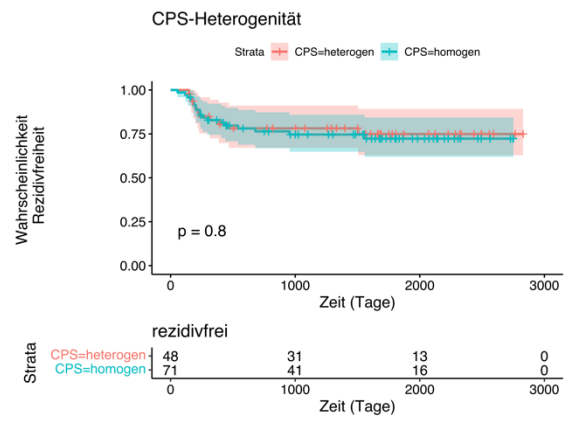
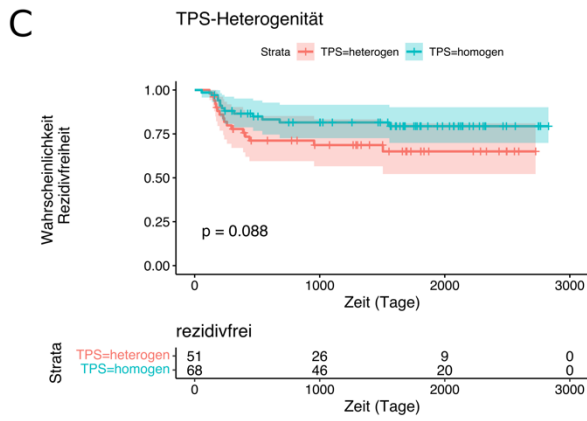


Abbildung 8: Heterogenität der PD-L1-Expression in den HNSCC-Tumorkollektiven.

Für die Bewertung der Heterogenität der PD-L1-Expression in Tumoren als prognostischer Parameter wurde die Einheitlichkeit der PD-L1-Scores zwischen jeweils drei Tumorstanzen betrachtet. Dies erfolgte für das gesamte Kollektiv (2008-2013 und 2013-2016). In dieser Abbildung ist die Heterogenitätsanalyse basierend auf den Kriterien, wie im Material und Methodenteil beschrieben, graphisch dargestellt.

A: Mittelwerte der drei Stenzen eines jeden Falles (X-Achse) sowie der Abstand vom kleinstem zum größten Wert (sog. Spannweite) eines jeden Falles (Y-Achse). Die Punkte mit blauem Rand geben die ermittelten TPS-Scores wieder. Punkte mit grünem Rand repräsentieren die ermittelten CPS-Scores. Der HPV-Status ist in der Farbe der Punkte kodiert: gelb=HPV-negativ, weiß=HPV-positiv. Der schattierte Bereich gibt den hypothetischen Raum wieder, in dem sich die TPS- und CPS-Werte bewegen können. Als „heterogen“ bezüglich der PD-L1-Expression wurden Fälle bewertet, bei denen der maximale Abstand der PD-L1-Scores in drei Stenzen größer ist als der Mittelwert. Dieses Kriterium trifft auf alle Fälle zu, welche oberhalb des blau eingezeichneten Dreiecks liegen. Alle Fälle unterhalb des blauen Dreiecks wurden als homogen hinsichtlich der jeweiligen „Scores“ klassifiziert.

B: Kontingenztafeln, welche den Zusammenhang zwischen TPS-/CPS-Scores, Heterogenität und HPV-Status darstellen.

Oben: Anzahl der Fälle mit homo- oder heterogenen TPS- und CPS-Scores. Mitte: Verteilung homo- und heterogener TPS-Scores auf HPV-positive und HPV-negative Fälle. Unten: Verteilung homo- und heterogener CPS-Scores auf HPV-positive und HPV-negative Fälle.

Weiterhin wird deutlich, dass HPV-positive Tumoren für den TPS-Score einen signifikant höheren Anteil an Fällen mit homogener PD-L1-Expression aufweisen (Fisher-Test $p=0,04$). Für den CPS-Score hingegen zeigte sich kein (oder nur ein sehr geringer) Unterschied bezüglich der Heterogenität der PD-L1-Expression zwischen HPV-negativen und HPV-positiven Fällen/ Fisher-test $p=0,6$).

Das Heterogenitätskriterium wurde auch dazu verwendet, um die prognostische Bedeutung (Rezidivfreiheit nach Strahlenchemotherapie) einer heterogenen PD-L1-Expression mithilfe von Kaplan-Meier Analysen zu ermitteln.

C: Zusammenhang zwischen Rezidivfreiheit und Heterogenität von TPS- (links) und CPS-Score (rechts) für HPV-negative Fälle. Für keinen der beiden „Scores“ konnte ein signifikant unterschiedliches Risiko für Fälle mit heterogener oder homogener PD-L1-Expression (p -Werte: TPS= 0,08 und CPS 0,8) ermittelt werden.

D: In multivariablen Analysen wurde die Heterogenität der PD-L1-Expression in Verbindung mit der Expressionsstärke und anderer klinisch wichtiger Parameter untersucht. Links: In der multivariablen Analyse lässt sich eine Patientengruppe (rote Linie) identifizieren, die entweder einen hohen TPS-Score ($>50\%$) oder eine heterogene PD-L1-Expression in den Tumorzellen (heterogener TPS-Score) aufweist. Diese Gruppe weist ein signifikant höheres Risiko für die Entstehung eines Rezidivs nach Strahlenchemotherapie auf als die Tumorgruppe mit einem TPS $<50\%$ und/oder homogener PD-L1-Expression (p -Wert=0,015). Rechts: Bei Berücksichtigung des L-Stadiums in Verbindung mit einer heterogenen PD-L1-Expression (TPS-Score) in der multivariablen Analyse lässt sich ebenfalls eine Subgruppe von Tumoren identifizieren, die einen heterogenen TPS-Score und eine lymphovaskuläre Infiltration L1-Status aufweisen und gleichzeitig ein signifikant höheres Risiko für ein Tumorrezidiv nach Therapie haben (rote Linie, p -Wert=0,00085).

3.5 Zusammenhang Rezidivbildung und PD-L1-Expression in HNSCC

Im Mittelpunkt der Betrachtungen zur PD-L1-Expression in HNSCC stand der klinische Endpunkt Rezidivfreiheit nach adjuvanter Radio(chemo)therapie. Die Rezidivbildung nach erfolgreicher Standardtherapie ist deshalb von zentraler Bedeutung, weil die Therapiemöglichkeiten für Tumorrezidive sehr stark eingeschränkt sind und der weitere klinische Verlauf eine sehr ungünstige Prognose aufweist. Da eine mögliche Therapiemodalität des HNSCC-Rezidivs die Immun-Checkpoint-Inhibition darstellt, ist es von großer Bedeutung, ob sich die PD-L1-Expression zwischen Primärtumor und Tumorrezidiv verändert oder unverändert bleibt. Häufig werden therapeutische Entscheidungen hierbei auf der Grundlage der Primärtumor-Diagnostik getroffen.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Dissertation auch der Frage nachgegangen, ob und inwiefern sich TPS- und CPS-Scores im Rahmen der Rezidivbildung verändern. Darüber hinaus ist auch der immunologische Status der Tumoren von großem Interesse, deshalb wurde auch der Immunphänotyp in diese Betrachtungen miteinbezogen.

Als Grundlage diente hierbei das Rezidiv-Kollektiv mit 20 Pärchen aus Primär- und Rezidiv-Tumoren (siehe Tabelle 3 und 4 im Anhang).

Bei dem paarweisen Vergleich zwischen Primärtumor und Rezidiv zeigte sich, dass es in der Mehrzahl der Fälle (75%) zu einer Veränderung, sowohl beim TPS- wie auch beim CPS-Score kommt (Zunahme der „Scores“ in 35%, Abnahme der „Scores“ in 40%, Abbildung 9). Dabei kommt der Abnahme der „Scores“ in 40% der Fälle eine besondere Bedeutung zu, da diese Fälle dann aufgrund der verminderten PD-L1-Expression schlechter auf eine Immun-Check-point Therapie ansprechen.

Eine Veränderung der Immunphänotypen zwischen Primärtumor und Rezidiv war ebenfalls in 60% der Fälle zu beobachten. Diese immunologischen Veränderungen können zudem dazu führen, dass der Tumor für das Immunsystem zunehmend unsichtbar wird.

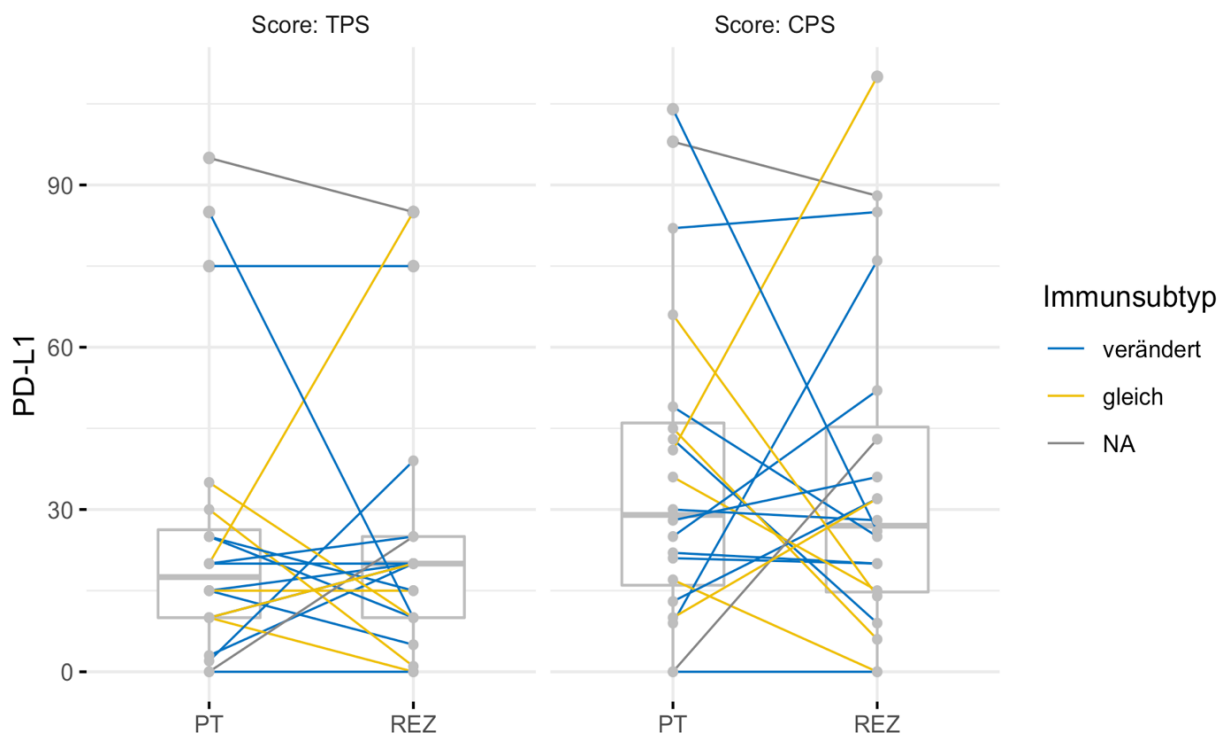


Abbildung 9: Änderung der PD-L1-Expression zwischen Primär- und Rezidivtumor

Links: Boxplot und paarweiser Vergleich für den TPS-Score zwischen Primärtumor und Rezidiv bei den 20 Tumorpaaren des Rezidiv-Kollektivs. Beim TPS-Score zeigt sich in 40% (n=8) eine Abnahme und in 40% (n=8) eine Zunahme des „Scores“ zwischen Primär- und Rezidivtumor, obwohl die Medianen (waagrechte Linien) annähernd gleichbleiben. In 20% (n=4) bleibt der „Score“ unverändert.

Rechts: Boxplot und paarweiser Vergleich für den CPS-Score zwischen Primärtumor und Rezidiv bei den 20 Tumorpaaren des Rezidiv-Kollektivs. Beim CPS-Score zeigt sich in 55% (n=11) eine Abnahme des „Scores“ zwischen Primärtumor und Rezidiv, wohingegen 40% (n=8) eine Zunahme des „Scores“ aufweisen, obwohl die Medianen (waagrechte Linien) annähernd gleichbleiben. 5% (n=1) bleiben unverändert.

Zwischen Primär- und Rezidivtumor zeigten 35% (n=7) eine Zunahme beider „Scores“ und 40% eine Abnahme (n=8). Bei 5% (n=1) bleiben beide „Scores“ unverändert.

Die Änderung des Immunphänotyps ist in beiden Boxplots durch verschiedenfarbige Verbindungslinien gekennzeichnet: eine blaue Linie stellt hierbei einen veränderten, eine gelbe Linie einen unveränderten Immunphänotyp dar. Der Immunphänotyp verändert sich in 60% (n=12) der Fälle und bleibt in 30% (n=6) gleich. 10% (n=2) waren bezüglich einer Veränderung des Immunsubtyps nicht auswertbar.

4 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurde vergleichend die PD-L1-Expression an zwei unabhängigen HNSCC-Kollektiven anhand der etablierten TPS- und CPS-Scores untersucht. Dabei wurden die PD-L1-Expressionsdaten unter verschiedenen Fragestellungen ausgewertet: 1) Wie korrelieren TPS-, CPS-Score und Immunphänotypen? 2) Wie korrelieren die PD-L1-Scores und der Immunstatus mit dem HPV-Status? 3) Welchen prognostischen Wert hat die PD-L1-Expression bei adjuvanter Radio(chemo)therapie? 4) Welche Bedeutung hat eine heterogene oder homogene PD-L1-Expression in den Tumoren? 5) Wie verändert sich die PD-L1-Expression zwischen Primärtumor und Rezidiv?

Wesentlich für die vergleichende Analyse und Beantwortung der genannten Fragestellungen ist eine in hohem Maße standardisierte PD-L1-Färbung und -Auswertung. Deshalb werden zunächst methodische Limitationen bei der Erfassung von TPS- und CPS-Scores diskutiert.

4.1 Methodische Limitationen bei der immunhistochemischen PD-L1-Färbung und Auswertung

Die immunhistochemische Färbung und Auswertung von PD-L1 erfordert einen hohen Grad an Standardisierung, um einerseits Ergebnisse in der Routine zwischen Kliniken/Pathologien vergleichen zu können und andererseits für die Indikationsstellung zur Immun-Checkpoint-Therapie einheitliche Kriterien zur Verfügung zu haben.

Die Bestimmung der PD-L1-Expression wird dabei von verschiedenen Parametern beeinflusst.

4.1.1 Immunhistochemische PD-L1-Färbung

An die Durchführung und Qualität der immunhistochemischen PD-L1-Färbung sind höchste Ansprüche zu stellen, da von Ihrem Ergebnis die weitere Therapieplanung abhängt und sie somit für den Patienten erhebliche Folgen bezüglich Lebensqualität, Prognose und Gesamtüberleben haben kann. Die PD-L1-Färbung sollte dabei eine hohe Spezifität und hohe Sensitivität aufweisen (Schildhaus, 2018).

Ein für die immunhistochemische Auswertung geeignetes Resektat sollte, wie in den Zulassungsstudien von Pembrolizumab aufgeführt, mindestens 100 vitale Tumorzellen enthalten, um so eine valide PD-L1-Auswertung durchführen zu können (Schildhaus, 2018).

Essenziell zur Durchführung einer validen immunhistochemischen PD-L1-Färbung sind die Wahl eines geeigneten Primärantikörpers und eines entsprechenden validierten Färbeprotokolls (Schildhaus, 2018). Um eine möglichst hohe Standardisierung der Immunfärbung zu erreichen, wird die PD-L1-Färbung heutzutage weitestgehend automatisiert durchgeführt. Hierzu werden in einem Färbeautomaten spezifische Färbeprotokolle unter Verwendung definierter Färbe-Kits und Antikörper etabliert und anhand integrierter Positiv- und Negativ-Kontrollen die Färbung fortlaufend überprüft. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu das Färbe-Kit „Ventana Benchmark Ultra“ (Ventana/Roche) verwendet.

Zur Vorbehandlung, die eine Epitop-Demaskierung bewirkt, wurde das System „Ultra Cell Conditioning Solution CC1“ (Ventana/Roche) verwendet, welches auf dem Prinzip der hitzeinduzierten Vorbehandlung beruht. Gemäß der aktuellen Studienlage weist der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper ein hohes Maß an Standardisierung und Validierung auf (DeRuiter, 2021). Es gibt zahlreiche Primärantikörper, welche für die Durchführung der PD-L1-Färbung geeignet sind. Dabei wurden die folgenden zugelassenen Antikörper-Klone etabliert: SP263, SP142, 28-8, 73-10, 22C3 (Downes, 2020).

Für die Anwendung bei HNSCC wurden kürzlich in einer Publikation drei verschiedene Färbekits und Antikörper miteinander verglichen, die auch den in dieser Arbeit verwendeten Antikörper SP263 einbezog (DeRuiter, 2021). In dieser und anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Vergleichbarkeit zwischen den zumeist verwendeten Antikörpern SP263, 28-8 und 22C3 sehr gut ist (Scheel, 2018; Hirsch, 2017). Auch in einer Studie von Cerbelli et al. wurde von einer hohen Übereinstimmung zwischen dem 22C3 PharmDx-Assay und dem SP263-Assay für eine Anwendung in HNSCC berichtet (Cerbelli, 2022). Die Verwendung verschiedener Antikörper erschwert die Vergleichbarkeit zunehmend, da für jeden Antikörper-Klon verschiedene PD-L1-Positivitäts-Kriterien bestehen (Ran, 2017). Dabei werden verschiedene Kriterien für die Färbung von Tumor- und Immunzellen, sowie für Schwellwerte für eine PD-L1-Positivität zugrunde gelegt. Darüber hinaus wird die PD-L1-Positivität durch verschiedene Faktoren wie zum Beispiel Tumorentität (Stovgaard, 2019), Tumorstadium (Manson, 2019) und vorangegangene Therapie (Sakai, 2019) beeinflusst.

Ein Hauptgrund für die Komplexität einer korrekten Bestimmung der PD-L1-Expression ist das mögliche Vorkommen von PD-L1 sowohl im Zytoplasma wie auch in der Zellmembran in deutlich variabler Expression (Yu, 2015). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete PD-L1-Antikörper SP263 von Ventana ist für den Nachweis des PD-L1-Proteins in FFPE-Gewebe von HNSCC validiert und wird zusammen mit dem Opti-View DAB IHC Detection Kit (Ventana) verwendet.

In der Praxis kommen oft verschiedene Färb-Assays zum Einsatz. Hieraus ergibt sich die Frage nach der Austauschbarkeit und der Konkordanz der verschiedenen Systeme. Torlakovic et al. verglichen in einer Metaanalyse für verschiedene Tumorentitäten die diagnostische Genauigkeit und Austauschbarkeit von drei etablierten Färb-Assays (PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, PD-L1 IHC 28-8 pharmDx, Ventana PD-L1 (SP263)) für einen TPS-Schwellwert von 1% und 50%. Hierbei zeigte sich, dass die von der „Food and Drug Administration“ (FDA) zugelassenen „Assays“, im Rahmen des zugelassenen Einsatzbereiches, eine hohe Konkordanz aufwiesen, sofern die Färbungen in einem spezialisierten immunhistochemischen Labor durchgeführt wurden (Torlakovic, 2020).

Unter Berücksichtigung aller publizierten Einflussparameter bei der immunhistochemischen PD-L1-Färbung wurde in der vorliegenden Arbeit mit Verwendung des Ventana SP263 „Assays“ ein bestmöglich standardisiertes Färbeverfahren für HNSCC verwendet (DeRuiter, 2021).

4.1.2 Auswerte-Scores für die immunhistochemische PD-L1-Färbung

Für die Quantifizierung der PD-L1-Expression von HNSCC finden vor allem zwei verschiedene „Scores“ Anwendung: Tumor Proportion Score (TPS) und Combined Positivity Score (CPS). Diese beiden „Scores“ werden im Abschnitt Material und Methoden detaillierter erklärt. Im Gegensatz zu dem aus den PD-L1-exprimierenden Tumorzellen gebildeten TPS-Score, bezeichnet der CPS-Score die Anzahl aller PD-L1-gefärbten Zellen (Tumorzellen und Immunzellen) (Schildhaus, 2018). Der Unterschied zwischen den beiden „Scores“ beruht folglich auf der Berücksichtigung der mononukleären Immunzellen im CPS-Score, wohingegen beim TPS-Score die PD-L1-Expression ausschließlich in den Tumorzellen gewertet wird.

Heutzutage wird die Auswertung der PD-L1-Expression in zertifizierten PD-L1-Zentren der Pathologischen Institute durchgeführt, in denen auch automatisierte Auswertesysteme Anwendung finden. Hierzu zählen auch Bildanalysewerkzeuge und bildanalytische Algorithmen wie das für das NSCLC entwickelte Programm „uPath“ der Firma Roche, das es erlaubt, den gesamten Schnitt zuverlässig und vollständig bezüglich der PD-L1-Expression analysieren zu können (diagnostics.roche.com, 2022)

Immun-Checkpoint-Inhibitoren werden heutzutage bei immer mehr Tumorentitäten eingesetzt, hierzu zählt vor allem das Maligne Melanom, nichtkleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC), Nierenzellkarzinom, Hodgkin-Lymphom, Urothelkarzinom, HNSCC, kutanes Plattenepithelkarzinom und das Merkelzellkarzinom (Zander, 2020).

Je nach Tumorentität und verwendetem Checkpoint-Inhibitor existieren verschiedene therapeutische Schwellwerte für TPS- und CPS-Scores, welche die Einleitung einer Therapie mit einem Immun-Checkpoint-Inhibitor rechtfertigen. Bisher wurde zumeist der TPS-Score als Richtwert für die Therapieentscheidung bezüglich einer Immun-Checkpoint-Therapie verwendet, der CPS-Score bekommt hier jedoch zunehmend mehr Bedeutung (Schulz, 2021). So hat sich beim Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) für die Therapie mit Pembrolizumab der TPS-Score mit Schwellwerten von $\text{TPS} > 50\%$ in der Erstlinientherapie (Reck, 2016) und $\text{TPS} > 1\%$ in der Zweitlinientherapie (Lopes, 2018) durchgesetzt (Bestimmung der PD-L1-Expression mit IHC 22C3 pharmDx™ Kit). Bei der Therapie des Malignen Melanoms gilt für die Einleitung einer Immun-Checkpoint-Inhibitor-Therapie aktuell ein TPS-Schwellwert von 5% als Empfehlung (Ugurel, 2020). Bei HNSCC existieren verschiedene therapeutische Schwellwerte für TPS- ($> 50\%$) und CPS- (> 1) Score. Bislang wird der CPS-Score analog zu anderen Tumorentitäten in der klinischen Routine deutlich seltener verwendet. Er könnte durch die im Vergleich zum TPS-Score stärkere Berücksichtigung des Immunzell-Tumormikromilieus jedoch eine bessere Entscheidungsgrundlage für die Indikation zur Immun-Checkpoint-Therapie darstellen als der TPS-Score. So hat sich beim Urothelkarzinom bereits der CPS-Score mit einem Schwellwert von > 10 für die Therapieeinleitung durchgesetzt (Vuky, 2020). Emancipator et al. konnten für HNSCC zeigen, dass bei einem CPS-Score > 50 beziehungsweise einem TPS-Score $> 50\%$ die prädiktive Aussagekraft der PD-L1-Expression zwischen beiden „Scores“ vergleichbar ist, der CPS-Score bei niedrigeren Schwellwerten jedoch bezüglich Therapieansprechen, Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben etwas sensitiver als der TPS-Score ist (Emancipator, 2021).

Die Zuverlässigkeit der immunhistochemischen PD-L1-Expression als prädiktiver Biomarker wurde unter anderem durch die Erkenntnis in Frage gestellt, dass auch PD-L1-negative HNSCC von einer Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren profitieren können (Ferris, 2018). Dieses Phänomen kann unter Umständen durch die variierende PD-L1-Expression zwischen Primarius und Rezidiv/Metastase erklärt werden (Wildsmith, 2018). Daneben bestehen auch methodische Unsicherheiten beim immunhistochemischen PD-L1-Scoring. Ein großes Problem stellt hierbei die unzureichende Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Auswertung dar, die sich in einer großen Variabilität der PD-L1-Ergebnisse zwischen mehreren Untersuchern widerspiegelt (sogenannte Interobserver-Variabilität). Somit wird die prädiktive Aussagekraft der PD-L1-Expression durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper, verschiedener „Scores“ und Untersucher, sowie einer zellintrinsischen Wirkung von PD-L1 stark eingeschränkt (Kornepati, 2022). Dabei ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Untersuchern allgemein sehr gut für die PD-L1-Scores der Tumorzellen, jedoch sehr variabel bei der Auswertung der PD-L1-exprimierenden Immunzellen. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass bei der Auswertung der PD-L1-exprimierenden Immunzellen sowohl eine zytoplasmatische wie auch eine membranständige PD-L1-Färbung gewertet wird (Büttner, 2017; Ventana, 2021). Trotz dieser methodischen Unsicherheiten kommt eine Metaanalyse zur Konkordanz und Vergleichbarkeit verschiedener PD-L1-Assays zu dem Schluss, dass eine mit über 90% sehr hohe Übereinstimmung zwischen verschiedenen Untersuchern besteht (Udall, 2018). Dabei wurden 26 PD-L1 Studien zum Bronchialkarzinom zwischen 2010 und 2016 verglichen. Es zeigte sich hierbei auch, dass in einigen Studien nicht klar definiert wurde, ob nur Tumorzellen (TPS-Score) oder Tumorzellen und PD-L1-exprimierende Immunzellen (CPS-Score) berücksichtigt wurden. Deshalb wurde eine stärkere

Standardisierung gefordert, die in späteren Studien auch umgesetzt wurde und so 2016 zur erstmaligen Einführung von einheitlichen PD-L1-Scores führte.

Ein Großteil der publizierten Studien zur methodischen Variabilität der PD-L1-Bestimmung bezieht sich auf das Lungenkarzinom und hier insbesondere auf das NSCLC. Nur wenige Studien beschäftigten sich bislang mit HNSCC (Wang, 2018; Rebelatto, 2016; Downes, 2020). Dabei wurden einerseits 100 HNSCC Fälle immunhistochemisch hinsichtlich PD-L1-Expression ausgewertet und dabei die Variabilität zwischen drei verschiedenen Untersuchern bewertet. Es wurde der Antikörper-Klon SP263 verwendet und der Schwellwert auf eine 25% PD-L1-Positivität festgelegt. Es zeigte sich eine Übereinstimmung von 96,3% für die Ergebnisse zwischen den Untersuchern und von 94,3% für die wiederholte Auswertung innerhalb eines Untersuchers (Rebelatto, 2016). In der zweiten Studie wurden lediglich 27 HNSCC Fälle ausgewertet und dabei unter Verwendung der Antikörper-Klone SP263 und SP142 die Variabilität der Auswertung zwischen drei Untersuchern bewertet. Die Übereinstimmung der Ergebnisse lag bei 93% für SP263 und 94% für SP142 (Wang, 2018).

Für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper-Klon SP263 zeigte sich bei Downes et al. bezüglich HNSCC eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen verschiedenen Untersuchern von 93% (Downes, 2020). Für die Auswertung der PD-L1-exprimierenden Immunzellen zeigt sich jedoch nur eine moderate Übereinstimmung zwischen verschiedenen Untersuchern (Downes, 2020). Somit ist die Auswertung des CPS-Scores (PD-L1 exprimierende Tumor- und Immunzellen) mit größeren Unsicherheiten behaftet. Der TPS-Score ist hingegen etwas einfacher in der Anwendung, hat jedoch den Nachteil, dass er die PD-L1-exprimierenden Immunzellen nicht berücksichtigt, welche jedoch gemäß der aktuellen Literatur und den Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle im Tumormikromilieu und bei der Immunreaktion des Tumors spielen (Partlova, 2015).

Wegen dieser Herausforderungen bei der PD-L1 immunhistochemischen Auswertung könnte ein strukturiertes Training des PD-L1-Scoring, sowie die Möglichkeit einer externen Validierungsmöglichkeit dessen Validität und Präzision deutlich verbessern (Schildhaus, 2018). Auch die oben genannten, automatisierten Auswerte-Algorithmen (unter anderem „uPath“, Firma Roche) (diagnostics.roche.com, 2022), sowie die Etablierung von PD-L1-Zentren können die Qualität der immunhistochemischen PD-L1-Diagnostik weiter verbessern.

4.2 Zusammenhang PD-L1-Expression und Immunzellinfiltration

In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Fälle je nach Stärke und Ausmaß der Immunzellinfiltration in vier Immunphänotypen eingeteilt. Die Stärke der Immunzellinfiltration wurde dabei durch eine immunhistochemische Anfärbung von CD3+ und CD8+ zytotoxischen T-Zellen bestimmt. Je nach Ausmaß der TILs-Infiltration erfolgte eine Unterteilung in: „hot“ (starke Infiltration zytotoxischer Lymphozyten), „cold“ (keine Infiltration zytotoxischer Lymphozyten), „immunosuppressed“ (Infiltration zytotoxischer Lymphozyten ohne Interaktion mit Tumorzellen) und „excluded“ (zytotoxische Lymphozyten ohne Infiltration in das Tumorgebe) klassifiziert (Kather, 2018) (Chen, 2017). Diese Immunphänotypen repräsentieren einen relevanten prognostischen Faktor bei vielen Tumorentitäten (Xu, 2020). Außerdem gibt es Hinweise, dass die Immunphänotypisierung eine prognostische Aussage bezüglich des Therapieansprechens ermöglicht (Galon, 2019). Darüber hinaus konnte in HNSCC bereits eine schlechtere Prognose für den Immunphänotyp „cold“ nachgewiesen werden (Ribbat-Idel, 2021).

Im Patientenkollektiv dieser Dissertation konnte weiterhin eine starke Korrelation zwischen TPS- und CPS-Score, sowie dem Immunphänotyp festgestellt werden. Auffällig war dabei eine positive Korrelation hoher TPS-/CPS-Scores (>80% />80) mit dem Immunphänotyp „hot“ (Abbildung 4). Dieser Zusammenhang ist besonders auffällig beim CPS-Score, da dieser die

PD-L1-exprimierenden Immunzellen berücksichtigt. Dabei fiel auf, dass „kalte“ Tumoren überwiegend PD-L1-negativ (oder sehr niedrig exprimiert) waren und „heiße“ Tumoren vor allem über den CPS-Score eine hohe PD-L1-Expression aufwiesen. Die intermediären Immunphänotypen („excluded“ und „immunosuppressed“) waren überwiegend bei mittleren TPS/CPS- Scores zu beobachten.

HNSCC gehören, unabhängig vom HPV-Status, zu den am stärksten durch Immunzellen infiltrierten Tumorentitäten (Mito, 2021). Hierbei kommt dem Tumormikromilieu und insbesondere den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) eine zentrale Bedeutung zu (Partlova, 2015). Ein hoher Anteil an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) ist mit einer besseren Prognose verbunden, da diese Immunzellen Tumorzellen eliminieren können. Dies drückt sich in einem längeren Gesamt- und progressionsfreien Überleben von Patienten mit einer hohen Infiltration von TILs aus (Balermpas, 2014/2016; Demaria, 2012; Fridman, 2012). Tumorzellen können der Immunantwort jedoch auch entgehen, indem sie TILs inaktivieren. Daher ist es im Rahmen zielgerichteter Therapien wichtig, die T-Zell Immunantwort zu optimieren, um Tumorzellen effizient eliminieren zu können (Bai, 2015).

Die TILs spielen ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Durchführung einer Radiotherapie, da hierbei eine Induktion der Immunantwort und eine Reduktion der therapeutischen Tumoresistenz erreicht wird (Burnette, 2011; Deng, 2014). Dabei ist eine hohe Expression PD-L1-positiver TILs bei HNSCC, Ovarial- und kolorektalem Karzinom mit einer besseren Prognose nach erfolgter Strahlentherapie verbunden (Darb-Esfahani, 2016; Badoual, 2013). Allerdings spielt hier die Lokalisation der TILs eine große Rolle. Im intratumoralen Kompartiment und in der invasiven Zone des Tumors, jedoch nicht im Stromal-Kompartiment, ist eine hohe TILs Konzentration mit einer verbesserten Prognose bezüglich lokoregionärer Kontrolle nach Strahlentherapie verknüpft (Balermpas, 2017).

In den Kollektiven, die im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurden, konnte ebenfalls eine Assoziation zwischen hoher Immunzell-Infiltration und einer längeren Rezidivfreiheit nach Radio(chemo)therapie bestätigt werden.

Dabei ist es eine wesentliche Stärke dieser Arbeit, dass alle Patienten der Studie eine einheitliche adjuvante Radio(chemo)therapie erhalten hatten. Das repräsentative Patientenkollektiv mit n=260 Fällen erlaubte es auch, den Einfluss des HPV-Status auf die PD-L1-Expression und den Immunphänotyp zu untersuchen.

4.3 Der Einfluss des HPV-Status auf PD-L1-Expression und Immunphänotyp

HPV-positive und HPV-negative HNSCC werden mittlerweile aufgrund ihrer verschiedenen Ätiologie, Tumorbilogie und Prognose als unterschiedliche Tumorentitäten klassifiziert (Ndiaye, 2014; O`Sullivan, 2016). Patienten mit HPV-positiven HNSCC weisen eine deutlich bessere Prognose auf als HPV-negative HNSCC (Lohaus, 2014). Hierfür werden zahlreiche Mechanismen wie beispielsweise eine Hochregulation von p53 oder eine veränderte Apoptose verantwortlich gemacht (Rischin, 2010). Es gibt jedoch eine Minderheit HPV-positiver Karzinome, welche eine deutlich schlechtere Prognose aufgrund eines erhöhten Therapieversagens aufweisen (Masterson, 2014; Mirghani, 2018). Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten keine geeigneten Kriterien etabliert werden, welche in der Lage sind, die beiden prognostisch differenten Gruppen der HPV-positiven HNSCC voneinander zu trennen (Ruangritchankul, 2019).

Auch die Immunogenität des Tumormikromilieus HPV-positiver HNSCC rückt immer mehr in das Zentrum wissenschaftlicher Arbeiten zu diesem Thema. Patienten mit einem hohen Anteil PD-L1-positiver TILs weisen signifikant weniger lokoregionäre und distale Tumor-Rezidive auf als Patienten mit einer niedrigen PD-L1-Expression.

Ebenso konnten Studien von Jung et al. und Ward et al. ein vermehrtes Vorkommen von TILs bei HPV-positiven HNSCC belegen, welche mit einem verbesserten Gesamtüberleben der Patienten einherging (Jung, 2013; Ward, 2014). Demgegenüber konnte in den Studien von Nasman et al., Nordfors et al. und Wansom et al. keine direkte Korrelation zwischen HPV-Status und einer Infiltration des Tumormikromilieus durch CD8⁺ TILs, sowie ein entsprechender Einfluss auf die Prognose gezeigt werden (Nordfors, 2013; Nasman, 2012; Wansom, 2012). Insofern gibt es in der publizierten Literatur widersprüchliche Befunde, die auch durch heterogene Patientenkollektive mit unterschiedlichen Therapiemodalitäten verknüpft sein können.

Deshalb konnte auch die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung des Zusammenhangs zwischen HPV-Status, PD-L1-Expression und Immunphänotyp leisten. Ähnlich dem DKTK-Patientenkollektiv (Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung) (Lohaus, 2014), waren auch in der vorliegenden Arbeit 24% (62 Fälle) der Fälle HPV-positiv und 76% (197 Fälle) HPV-negativ. Es fiel auf, dass die HPV-positiven Fälle zumeist auch einen höheren TPS- und CPS-Score aufwiesen. Dies traf insbesondere auf den CPS-Score zu, da bei HPV-positiven Karzinomen der Anteil PD-L1-exprimierender Immunzellen im Vergleich zu den HPV-negativen Karzinomen deutlich erhöht ist. Dies ging einher mit einem vermehrten Auftreten von TILs im Tumormikromilieu HPV-positiver Karzinome (Partlova, 2015). Auch im untersuchten Patientenkollektiv deutete der in Abbildung 5 gezeigte Unterschied zwischen CPS- und TPS-Score auf einen signifikanten Anteil PD-L1 positiver Immunzellen in HPV-positiven Tumoren hin. Ebenso zeigte sich in den Analysen der Immunphänotypen eine verstärkte Infiltration der HPV-positiven HNSCC mit CD8-positiven TILs, was sich im vermehrten Auftreten des „hot“ Immunphänotyps widerspiegelte.

Somit zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine positive Korrelation zwischen hohen CPS-Scores und einem positiven HPV-Status, was die erhöhte Immunzellinfiltration bei HPV-positiven HNSCC bestätigte.

4.4 Prognostischer Wert der PD-L1-Expression in HPV-negativen HNSCC nach adjuvanter Radiochemotherapie

4.4.1 PD-L1-Expression als prädiktiver Biomarker für die Immun-Checkpoint-Inhibition

Die immunhistochemische PD-L1-Expression stellt einen etablierten prädiktiven Biomarker dar, um die Wirkung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren in der Tumorthherapie von rekurrenten/metastasierten HNSCC vorherzusagen. Dies ist von großer Bedeutung, um geeignete Patienten für eine Immuntherapie zu selektieren und eine prädiktive Aussage bezüglich des Therapieansprechens treffen zu können (Li, 2019), da nur circa 20% der Patienten adäquat auf die Therapie ansprechen (Ferris, 2016; Cohen, 2019; Seiwert, 2019; Burtness, 2019).

Zahlreiche Studien konnten einen Zusammenhang zwischen einer hohen PD-L1-Expression und einem verbesserten klinischen Verlauf nach Immun-Checkpoint-Inhibition bei soliden Tumoren zeigen (Lu, 2019; Meng, 2015). Ferris et al berücksichtigten bei HNSCC ausschließlich die PD-L1-exprimierenden Tumorzellen und konnten den oben genannten Zusammenhang für einen TPS-Schwellwert von >1%, >5% und >10% belegen (Ferris, 2016). Seiwert et al und Chow et al konnten auch unter Berücksichtigung der PD-L1-exprimierenden Immunzellen ein verbessertes Therapieansprechen für einen CPS-Score >1 aufzeigen (Seiwert, 2016; Chow, 2016).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für HNSCC in drei großen Studien Schwellwerte für eine erfolgversprechende Immun-Checkpoint Inhibition etabliert:

In der **Checkmate-141**-Studie wurde ausschließlich der TPS-Score berücksichtigt und es zeigte sowohl bei einem TPS-Schwellwert von 1%, 5% und 10% ein verbessertes Gesamtüberleben in der Nivolumab-Gruppe im Vergleich zum „Standard of Care“ (konventionelle Chemotherapie) und führte zur aktuell gültigen Zulassung von Nivolumab für die Zweitlinientherapie des rezidivierenden/metastasierten HNSCC unabhängig von der PD-L1-Expression (Ferris, 2016).

In der **Keynote-40-Studie** wurden Patienten mit einem nach Platin-haltiger Chemotherapie rezidivierenden oder metastasierten HNSCC randomisiert zwischen einer Pembrolizumab-Monotherapie und konventioneller Chemotherapie (MTX, Docetaxel oder Cetuximab).

Hierbei zeigte sich ein signifikant besseres Gesamtüberleben für Patienten mit einem CPS-Score >1 (OS 8,7 vs. 7,1 Monate, p-Wert=0,0078). Bei einem CPS-Score <1 zeigte sich kein eindeutiger Vorteil der Pembrolizumab-Gruppe. Weiterhin zeigte sich in der Keynote-40, dass Patienten mit einem TPS-Score >50% unter Pembrolizumab-Therapie ein signifikant besseres Ansprechen und Gesamtüberleben aufwiesen (Cohen, 2019).

In der **Keynote-48-Studie** erfolgte eine Randomisierung auf drei Untersuchungsarme: 1. Pembrolizumab-Monotherapie, 2. Pembrolizumab+ Platinderivat oder 5-FU, 3. EXTREME-Chemotherapie. Unter Pembrolizumab mit Chemotherapie, wie auch in der Pembrolizumab-Monotherapie zeigte sich für CPS-Score >1 und >20 ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben als in der EXTREME-Gruppe (Burtness, 2019).

Die Keynote 48-Studie führte durch ein signifikant gesteigertes Therapieansprechen auf Pembrolizumab bei einem CPS-Schwellwert von >1 und >20 schließlich zur Einführung von Pembrolizumab in die Erstlinientherapie des rezidivierenden/metastasierten HNSCC (Burtness, 2019).

HNSCC zeigen oftmals eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität und somit eine große Spannbreite bei der PD-L1-Expressionen und der davon abgeleiteten TPS- und CPS-Scores innerhalb eines Tumors (Rasmussen, 2019). Eine weitere Besonderheit bei HNSCC ist das Vorliegen einer intertumoralen Heterogenität der PD-L1-Expression, also einer variierenden PD-L1-Expression zwischen den Tumoren verschiedener Patienten. So wiesen in der Keynote-48-Studie 85% der Patienten einen CPS-Score >1 und 43% einen CPS-Score >20 auf (Burtness, 2019). Zahlreiche weitere Studien bestätigen diese große Spannweite der PD-L1-Expression innerhalb eines Studienkollektivs (Lenouvel, 2021; Sanchez-Canteli, 2020; Maruse, 2018).

Auffällig dabei ist, dass auch circa 4-16% der PD-L1-negativen Patienten auf eine Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren ansprechen. Ebenso ist das 6- und 12 Monats-Gesamtüberleben zwischen PD-L1-negativen und PD-L1-positiven Patienten vergleichbar, was einen therapeutischen Vorteil auch für die Gruppe der PD-L1-negativen Patienten nahelegt (Evrard, 2020).

In Anbetracht dieser Erkenntnisse ist die PD-L1-Expression kein absolut zuverlässiger prädiktiver Biomarker für die Vorhersage einer erfolgreichen Immun-Checkpoint-Therapie bei HNSCC. Allerdings legen die Befunde nahe, dass der CPS-Score im Vergleich zum TPS-Score eine bessere Vorhersagekraft bei HNSCC aufweist.

4.4.2 PD-L1-Expression als prognostischer Marker nach adjuvanter Radiochemotherapie

Obwohl die immunhistochemische Bestimmung der PD-L1-Expression mittlerweile einen etablierten prädiktiven Marker für die Prognose einer Immun-Checkpoint-Inhibition darstellt, ist die prognostische Bedeutung der PD-L1-Expression für den klinischen Verlauf nach einer Standardtherapie (z.B. adjuvante Radio(chemo)therapie) weiterhin unklar. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die PD-L1-Expression anhand von zwei adjuvant behandelten HPV-negativen HNSCC-Patientenkollektive mittels TPS- und CPS-Score bestimmt.

In der Arbeit von Skinner et al konnte eine signifikante Assoziation zwischen einer hohen PD-L1-Expression und dem Auftreten eines lokoregionären Rezidivs ($p=0,021$) bei HPV-negativen HNSCC gezeigt werden. Nach drei Jahren wiesen Patienten mit einer hohen PD-L1-Expression in 50% der Fälle und Patienten mit einer niedrigeren PD-L1-Expression in 20 % der Fälle ein lokoregionäres Rezidiv auf (Skinner, 2017). In der genannten Studie zeigte sich vor allem auch eine starke Assoziation zwischen den CD8+-TILs und der PD-L1-Expression. Eine andere Studie konnte hingegen weder bei HPV-positiven noch bei HPV-negativen Fällen, einen prognostischen Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens zwischen PD-L1-positiven und PD-L1-negativen Fällen finden (Kim, 2016). Kim et al definierten in Ihrer Studie die Fälle als PD-L1-positiv, welche einen TPS-Score $>20\%$ aufwiesen. Wie bereits weiter oben dargestellt, konnten Balermipas et al zeigen, dass HPV-positive HNSCC eine signifikant höhere Infiltration durch CD8+ und PD-L1-positive Zellen aufweisen als HPV-negative Fälle. Patienten mit HPV-negativen Tumoren zeigten bei hoher PD-L1-Expression ($>5\%$) ein signifikant geringeres Risiko für das Auftreten von lokalen oder distanten Metastasen im Vergleich zu Patienten mit niedriger PD-L1-Expression ($<5\%$) (Balermipas, 2017). All die genannten Studien hatten allerdings meist keinen der etablierten PD-L1-Scores verwendet. Nur bei Skinner et al. und Kim et al ist klar, dass die Aussagen auf dem TPS-Score beruhen. Deshalb ist es für die Etablierung der PD-L1-Expression als prognostischen Marker notwendig, Schwellwerte für standardisierte TPS- und CPS-Scores zu identifizieren, die ein Patientenkollektiv in unterschiedliche Risikogruppen für einen bestimmten klinischen Endpunkt (z. B. Überleben, Rezidivfreiheit) stratifizieren.

Hierzu wurde in dieser Dissertation zum einen die Frage gestellt, ob die bereits etablierten therapeutischen Schwellwerte auch prognostische Schwellwerte für den Verlauf nach adjuvanter Radio(chemo)therapie darstellen. Deshalb wurden die für HNSCC etablierten Schwellwerte (TPS $>50\%$, CPS >1 , CPS >20) in statistischen Analysen der ermittelten TPS- und CPS-Scores für den klinischen Endpunkt Rezidivfreiheit überprüft. Da sich mit diesen therapeutischen Schwellwerten außer für TPS/CPS >1 keine signifikante Risikostratifizierung erreichen ließ, wurde systematisch nach optimalen Schwellwerten für den TPS- und CPS-Score gesucht. Hierzu wurde als klinischer Endpunkt wiederum Rezidivfreiheit nach Strahlentherapie gewählt und die beiden Kollektive in ein HPV-negatives „Discovery“ (KKG-Kollektiv 2008-2013) und Validierungs-Kollektiv (KKG 2013-2016) eingeteilt. Beim Vergleich der p-Werte aller Analysen (Abbildung 6) ergaben sich wiederum Schwellwerte mit einer signifikanten Risikostratifizierung der Patienten bei TPS=1% und CPS =1 mit $p<0,05$. Dieser CPS-Wert stellt auch gleichzeitig den üblicherweise verwendeten therapeutischen Schwellwert dar (Abbildung 6A).

Da in der publizierten Literatur auch andere Schwellwerte berichtet wurden und zudem die potenziellen Schwellwerte aus dem „Discovery“-Kollektiv bei dem TPS-Score mit 45% und dem CPS-Score mit 25 sehr nahe an den therapeutischen Schwellwerten von 50% für den TPS und 20 für den CPS liegen, wurden diese auch im Validierungs-Kollektiv überprüft. Hier ergab sich allerdings keine signifikante Stratifizierung in Risikogruppen. Dies ist insofern bemerkenswert als Skinner et al. (Skinner, 2017) von einem Schwellwert für den TPS-Score von 30% berichtete, der eine Risikogruppe mit schlechterem klinischem Verlauf bezüglich des Auftretens eines lokoregionären Rezidivs ($p=0,0034$) identifizierte. In einer anderen Publikation von Balermipas et al wurde ein Schwellwert von 5% berichtet, der allerdings bei hohen PDL1-Expressionen einen besseren klinischen Verlauf bezüglich der Endpunkte Gesamtüberleben (OS), lokal-progressionsfreies Überleben (LPFS) und distante Metastasen-freies Überleben (DMFS) anzeigte (Balermipas, 2017). Allerdings ist diese Publikation schwierig zu interpretieren, da kein standardisierter „Score“ (TPS oder CPS) für die PD-L1-Expression verwendet wurde. Als PD-L1-positiv wurden bei Balermipas et al solche Fälle gewertet, welche einen Anteil von PD-L1-positiven Tumor- und myeloischen Zellen von mehr als $>5\%$ aufwiesen. Außerdem

waren bei Balermipas sowohl HPV-positive und HPV-negative HNSCC enthalten, wohingegen Skinner et al und die vorliegende Promotion sich auf HPV-negative HNSCC konzentrierte.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine sehr kleine Subgruppe von Patienten mit einer sehr niedrigen PD-L1-Expression (TPS/CPS <1) identifiziert werden, die ein hohes Risiko für die Entwicklung eines Rezidivs aufweist. Diese Risikogruppe mit sehr niedriger PD-L1-Expression im Zusammenhang mit Rezidiventstehung wurde bisher nicht in der publizierten Literatur beschrieben. Es war darüber hinaus auffällig, dass mit linearen Schwellwerten bei höherer PD-L1-Expression keine Risikogruppe von Patienten mit einem schlechteren klinischen Verlauf in den untersuchten LMU-HNSCC-Kollektiven nachgewiesen werden konnte. Das ist im Widerspruch zu den von Skinner et al (Skinner, 2017) publizierten Daten. Die Gründe hierfür können verschieden sein. Ein Unterschied besteht in der Zusammensetzung der Kollektive, welche sich vor allem hinsichtlich der Tumorlokalisation unterscheiden. Während bei Skinner et al. Mundhöhlen- und Larynxkarzinome dominierten, waren in der vorliegenden Arbeit vorwiegend Patienten mit Oropharynx- und Mundhöhlenkarzinomen enthalten. Es muss jedoch betont werden, dass auch in der vorliegenden Arbeit Larynxkarzinome eingeschlossen wurden, jedoch im Vergleich zu Skinner et al. zu einem geringeren Prozentsatz. Weiterhin unterscheidet sich die vorliegende Arbeit in der Verwendung eines anderen Primärantikörpers (SP263) gegenüber der Arbeit von Skinner et al. (SP142).

Es besteht auch die Möglichkeit, dass sich die Risikogruppen nicht durch lineare Schwellwerte, sondern nur durch komplexere Schwellwerte definieren lassen. Das würde bedeuten, dass bei TPS-/CPS-Scores >1 unterschiedliche Patientensubgruppen mit höherem und niedrigerem Rezidivrisiko bei verschiedenen PD-L1-Expression vorliegen. Dies ließe sich nur durch eine mathematische Modellierung der erhaltenen „Scores“ mit verschiedenen Polynom-Modellen herausfinden. Dies war allerdings im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr möglich. Für diese Annahme spricht, dass die Interaktion von TPS- und CPS-Score (Abbildung 7A) zwei Risikogruppen von Patienten ergeben hat und ebenfalls die Kombination des TPS-Scores mit klinischen Parametern wie ECE und T-Stadium eine Stratifizierung der Patienten ermöglichte (Abbildung 7B).

4.4.3 Korrelation der PD-L1-Expression mit anderen klinischen Parametern

Neben PD-L1 als möglichem prognostischen Biomarker gibt es weitere Faktoren, welche bekanntermaßen eine prognostische Bedeutung bei HNSCC haben. Den größten Einfluss auf die Prognose hat wie bereits oben beschrieben der HPV-Status, weswegen auch in der vorliegenden Arbeit die Patienten nach HPV-Status aufgetrennt wurden und der prognostische Wert der PD-L1-Expression nur in HPV-negativen Patienten untersucht wurde. Weiterhin konnten einige Studien den Einfluss der Tumorgröße (T-Stadium) auf Lymphknotenmetastasen, Rezidiventstehung und das Gesamtüberleben zeigen (Woolgar, 2003). Vor allem die Tumordinfiltrationstiefe hat hier einen Einfluss auf die Tumorprogression (Woolgar, 2006). Ein weiterer Faktor, welcher Einfluss auf die Prognose und Rezidiventstehung hat, ist der histologische Differenzierungsgrad, wobei weniger differenzierte HNSCC zumeist eine schlechtere Prognose aufweisen (Wing, 2002). Weitere zusätzliche Risikofaktoren für die Entstehung von Lokalrezidiven und distanten Metastasen sind die Lymphgefäßinfiltration (LVI) (Woolgar, 2006) und Perineuralscheideninfiltration (Pn1). Letztere bezeichnet eine Tumordinfiltration von angrenzenden Nerven und ist vor allem bei Mundhöhlenkarzinomen mit einer schlechten Prognose hinsichtlich eines verkürzten Gesamtüberlebens und eines erhöhten Vorkommens von Lokalrezidiven und regionalen Metastasen assoziiert (Kim, 2019; Sobin, 2010; Li, 2021). Der Zusammenhang zwischen PD-L1-Expression und Tumorgröße (T-Stadium) ist kontrovers diskutiert. Wusiman et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression in Tumor-

und Immunzellen, dem Tumorstadium und der Tumorlokalisation bei einem CPS-Schwellwert von >1 aufzeigen. Bei einem Schwellwert von $\text{CPS}>20$ konnte außerdem ein positiver Zusammenhang mit einer nodalen Metastasierung nachgewiesen werden. Bezüglich der klinischen Endpunkte Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben zeigte sich jedoch kein Zusammenhang zur PD-L1-Expression von Tumor- und Immunzellen bei einem CPS-Schwellwert von >1 oder $\text{CPS}>20$ (Wusiman, 2022).

Die aktuelle Studienlage bezüglich des Zusammenhangs von PD-L1-Expression und klinischem „Outcome“ ist kontrovers. Während Sanchez-Canteli et al und Chen et al eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten PD-L1-Expression und einem verbesserten Überleben aufzeigten (sowie bei Chen et al zusätzlich eine Korrelation zwischen erhöhter PD-L1-Expression und geringerer Rezidivbildung) (Sanchez-Canteli, 2020; Chen, 2019), legten andere Studien einen negativen Zusammenhang zwischen einer hohen PD-L1-Expression und dem Gesamtüberleben dar (Lenouvel, 2020; Moratin, 2019; Kim, 2019).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der multivariablen Analyse der PD-L1-Expressionsdaten in HPV-negativen HNSCC ein Zusammenhang der PD-L1-Expression mit dem T-Stadium und ECE gezeigt werden. Hierbei ist bemerkenswert, dass unter Berücksichtigung der Interaktion von TPS- und CPS-Score (CPS als Mittelwert plus Produkt aus TPS- und CPS-Score), sowie Vorliegen eines hohen T-Stadiums und/oder extrakapsulären Wachstums eine Risikogruppe von Patienten stratifiziert werden konnte, die ein signifikant höheres Risiko für das Auftreten eines Rezidivs nach erfolgter Radiochemotherapie hat (Abbildung 7B). Patienten mit einem hohen Tumorstadium (III/IV) und/oder extrakapsulärem Wachstum (ECE) zeigen auch in der Literatur ein signifikant erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Lokalrezidivs oder distanter Metastasen (Haque, 2019). Ungefähr 50% aller Hochrisiko-Patienten (ECE und/oder Stadium III/IV) entwickeln ein Lokalrezidiv (Brockstein, 2004).

Somit konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass - obwohl für höhere PD-L1-Expression allein kein erhöhtes Risiko für eine Rezidivbildung gefunden wurde - der PD-L1-Score in Verbindung mit einem vorliegenden extrakapsulären Wachstum und/oder einem hohen T-Stadium ein erhöhtes Risiko für eine Rezidivbildung hatte (Abbildung 5B). Der R-Status und das N-Stadium waren gemäß der durchgeführten multivariablen Analyse und entgegen einigen Studien (Bernier, 2004) (Cooper, 2004) nicht mit einem erhöhten Rezidivrisiko verbunden.

4.5 Heterogenität der PD-L1-Expression in HNSCC

HNSCC ist ätiologisch, biologisch, immunologisch und klinisch eine sehr heterogene Erkrankung (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Trotz stetiger Fortschritte in der multimodalen Behandlung von HNSCC, liegt die 10-Jahres-Überlebensrate abhängig vom HPV-Status, Tumorstadium und Tumorlokalisation zwischen 87% (HPV-positives Oropharynxkarzinom) und 51% (HPV-negatives Hypopharynxkarzinome) (Du, 2019).

Durch die Einführung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren konnten die Therapieoptionen für rezidivierende und metastasierte Tumore deutlich erweitert werden. Es gibt dennoch auch bei diesen modernen Therapien noch einen recht hohen Anteil an therapieresistenten Tumoren. Intratumorale Heterogenität könnte eine Ursache für diese Phänomene sein.

Zahlreiche Studien konnten eine molekulare Heterogenität des Genoms, Transkriptoms und der Tumor-assoziierten immunologischen Komponente aufzeigen (Keck, 2015; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Mandal, 2016). Insbesondere HNSCCs zeichnen sich durch eine starke intratumorale Heterogenität aus (Roest, 2019; Huang, 2021; McGranahan, 2017; Puram, 201; Rasmussen, 2019).

Deshalb sollte im Rahmen dieser Dissertation die intratumorale PD-L1-Expression systematisch untersucht werden. Dabei wurden TPS- und CPS-Scores zwischen den einzelnen Stanzan desselben HNSCC-Falls auf den „Tissue-Micro-Arrays“ für die LMU-Kollektive 2008-13 und 2013-2016 betrachtet. Nach der im Abschnitt Material- und Methoden genannten Definition für PD-L1-Heterogenität, wurden in der vorliegenden Dissertation für den TPS-Score 38%, sowie für den CPS-Score 39% als heterogen eingestuft. Der Großteil der Fälle wurde folglich als homogen eingestuft. Auffällig hierbei war allerdings das Überwiegen HPV-positiver unter den homogenen Fällen (Abbildung 8B). Um die Heterogenitätsklassifikation auf Grundlage der einzelnen Tumorstanzen zu überprüfen, wurden 18 Fälle, die als homogen/heterogen eingestuft wurden auch auf kompletten Schnitten unabhängig klassifiziert. Hierbei zeigte sich größtenteils eine übereinstimmende Bewertung, lediglich ein Fall wurde im Gesamtschnitt anders klassifiziert als nach Auswertung auf Ebene der TMA-Stanzen. Hierbei ist zu betonen, dass bei der Ermittlung von TPS- und CPS-Scores aus kompletten Schnitten eine heterogene Verteilung der PD-L1 bei der Auswertung eliminiert wird, indem Teilergebnisse aus verschiedenen Quadranten gemittelt werden (Schildhaus, 2018). Das Problem ist deshalb, dass in vielen Fällen eine Heterogenität vorliegen könnte, die bei der diagnostischen Befundung nicht erfasst wird. Dies könnte Auswirkungen auf das Ansprechen von Immun-Checkpoint Inhibitoren haben.

Eine heterogene PD-L1-Expression kann unterschiedliche Ursachen haben (Rasmussen, 2019). Zum einen können technische Gründe wie verschiedene Antikörper, Scoring-System und Schwellwerte (Hirsch, 2017; Rimm, 2017) dafür verantwortlich sein. Zum anderen können klinische Gründe wie die Art und Qualität der Biopsie das Ausmaß an Heterogenität beeinflussen, oder auch die Variabilität der Auswertung zwischen verschiedenen Untersuchern eine Rolle spielen (Wang, 2018; Rehman, 2017).

Schließlich kommen auch biologische Ursachen wie beispielsweise eine heterogene PD-L1-Expression innerhalb des Tumors in Betracht (Bhajee, 2016; McLaughlin, 2016). Die intratumorale Heterogenität stellt dabei eine der Hauptursachen für eine erschwerte standardisierte und validierbare PD-L1-Auswertung dar, da sie zu einer Erhöhung der Variabilität bei der Auswertung und zu einer Reduktion der Reproduzierbarkeit führt.

Es stellt sich allerdings hier auch die Frage, ob eine heterogene PD-L1-Expression nicht auch einen zusätzlichen Prognosefaktor bei der PD-L1 Bewertung darstellen könnte, weil PD-L1 getriebene intrinsische Vorgänge (z.B. Aktivierung von „Pathways“) in den Tumorzellen innerhalb eines Tumors dann unterschiedlich ablaufen.

Auf Grundlage der Heterogenitätsanalyse in der vorliegenden Arbeit wurde auch deutlich, dass sich in der multivariablen Analyse eine Patientengruppe selektieren lässt, welche entweder einen TPS-Score > 50% oder eine heterogene PD-L1-Expression im TPS-Score aufweist und ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines HNSCC-Rezidivs nach erfolgter Radiochemotherapie aufweist (Abbildung 8D). HNSCC mit heterogenen TPS-Scores und einer lymphovaskulärer Infiltration (L1-Status) zeigten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein erhöhtes Rezidivrisiko.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte somit die Hypothese formuliert werden, dass eine heterogene oder hohe PD-L1-Expression in den Tumorzellen (TPS-Score) eine Auswirkung auf den Therapieerfolg bei einer adjuvanten Radiochemotherapie haben kann, insbesondere wenn sie in Verbindung mit einem positiven L-Status auftritt. Eine heterogene PD-L1-Expression in Verbindung mit den infiltrierenden Immunzellen (CPS-Score) hat hingegen keine prognostische Bedeutung nach einer adjuvanten Radiochemotherapie.

Dieser prognostische Zusammenhang zwischen Heterogenität der PD-L1-Expression und Rezidivfreiheit nach adjuvanter Radiochemotherapie müsste in einem unabhängigen Patientenkollektiv validiert werden, da aus Gründen der statistischen Power keine Aufteilung in ein

„Discovery“- und Validierungs-Kollektiv erfolgen konnte. Da die Heterogenität von Tumorzellen und Zellen des Tumormikromilieus eine der zentralen Ursache für Therapieresistenz bei HNSCC darstellt, ist ein besseres Verständnis von molekularer und zellulärer Heterogenität und die Anwendung des Wissens auf die Therapieplanung essenziell (Marusyk, 2020). Auf Grund dieser Zusammenhänge zwischen Tumorerheterogenität, Therapieresistenz und Rezidiventstehung wurde im Rahmen dieser Dissertation auch die PD-L1-Expression zwischen Primärtumoren und Rezidiven verglichen.

4.6 PD-L1-Expression in HNSCC bei Primärtumoren und Rezidiven

Trotz modernster multimodaler Therapieansätze entwickeln 15-50% aller Patienten nach erfolgter Radiochemotherapie ein lokales Tumorrezidiv (Leeman, 2017; Oksuz, 2011) und selbst bei histopathologisch R0-resezierten HNSCC beträgt das Rezidiv-Risiko noch 10-30% (Tabor, 2004; Leemans, 1994; Sutton, 2003). Deshalb sollten Tumore, welche ein erhöhtes Rezidiv-Risiko aufweisen (große Primärtumoren (T3/T4), unvollständige (R1/R2) oder knappe („close margins“) Tumorresektion im gesunden Gewebe, ein Einbruch in Lymph- (L1) oder Blutgefäße (V1), ein extranodales (Pn1) oder extrakapsuläres Wachstum (ECE)) einer adjuvanten Radio(chemo)therapie unterzogen werden (Bernie, 2004; Cooper, 2004).

Bei dieser Therapiemodalität sind lokale Tumorrezidive definiert als Tumore, welche innerhalb von drei Jahren nach Abschluss der multimodalen Therapie im Hochdosis-Strahlenfeld der ursprünglichen Radiotherapie auftreten und weniger als 2 cm vom Primärtumor entfernt liegen (Braakhuis, 2002).

Das Auftreten eines Rezidivs nach adjuvanter Radio(chemo)therapie wird im Wesentlichen erklärt durch im Gewebe verbliebene Tumor-assoziierte und genetisch entartete Zellen, die gegenüber der initialen Therapie resistent waren und aus denen sich im Verlauf erneut ein invasives Karzinom entwickeln konnte (Braakhuis, 2002; Houten, 2002; Tabor, 2004).

In früheren Studien konnte schon gezeigt werden, dass zwischen Primärtumor und dessen Metastase(n) eine Änderung der PD-L1-Expression stattfinden kann, was eine mögliche Änderung der PD-L1-Expression im Rahmen der Tumorprogression nahelegt. So zeigten bei Callea et al. 21% der Fälle mit einem Nierenzellkarzinom eine Änderung der PD-L1-Expression zwischen Primarius und dessen Metastase(n) (Callea, 2015).

Aufgrund dessen kann eine erneute PD-L1-Bestimmung an einer Biopsie der Metastase sinnvoll sein, da sich die PD-L1-Expression mit fortschreitender Tumorerkrankung und durchgeführter Therapien ändern kann (Munari, 2018; Deng 2014).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Veränderung der PD-L1-Expression zwischen Primär- und Rezidiv-Tumor nach erfolgter Radio(chemo)therapie gezeigt werden. Bei dem paarweisen Vergleich zwischen Primärtumor und Rezidiv zeigte sich, dass es in der Mehrzahl der Fälle (75%) zu einer Veränderung sowohl beim TPS- wie auch beim CPS-Score kommt. (Zunahme der „Scores“ in 35%, Abnahme der „Scores“ in 40%, Abbildung 9). Dabei kommt der Abnahme der „Scores“ in 40% der Fälle eine besondere Bedeutung zu, da diese Fälle dann aufgrund der verminderten PD-L1-Expression schlechter auf eine Immun-Checkpoint-Therapie ansprechen. Eine Veränderung der Immunphänotypen zwischen Primärtumor und Rezidiv war ebenfalls in 60% der Fälle zu beobachten (Abbildung 9). Diese immunologischen Veränderungen könnten zudem dazu führen, dass der Tumor für das Immunsystem schwerer zu detektieren ist.

Hinsichtlich des molekularen Vergleichs zwischen assoziierten Primärtumoren und Rezidiven gibt es nur sehr wenig wissenschaftliche Arbeiten, da solche Tumorkollektive sehr selten sind. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnten anhand eines Vergleichs zwischen Primarius und Rezidiv-HNSCC gezeigt werden, dass in ca. 50% der Fälle ein Wechsel des

vorherrschenden molekularen Subtyps im Rahmen der Rezidivbildung stattfindet, (Weber, 2022). Dieser Wechsel des Subtyps war entweder mit einer reduzierten Expression der Antitumor-Immunantwort oder mit einer verstärkten Expression der partiellen epithelial-mesenchymale Transition (p-EMT) assoziiert, was auf einer erhöhten Tumoraggressivität hindeutet (Puram, 2017; Waterman, 2021).

In Verbindung mit diesen publizierten Daten können die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation weitere wertvolle Erkenntnisse für eine individualisierte Tumorthherapie bei HNSCC liefern. Prognostisch ist vor allem eine Subgruppe von Tumoren mit einer niedrigen PD-L1-Expression und einem „cold“ Immunphänotyp von Bedeutung, da diese Tumoren mit einem stark erhöhten Rezidivrisiko für eine zielgerichtete Therapie in Frage kommt. Hierzu müssten zum Beispiel die molekularen Subtypen bestimmt werden, um Ansatzpunkte für eine zielgerichtete molekulare Therapie zu haben. Ebenso ist eine heterogene PD-L1 Expression bezüglich des klinischen Verlaufs nach Radio(chemo)therapie problematisch. Hier müssten vermutlich kombinierte Therapieansätze entwickelt werden, die eine Immun-Checkpoint Inhibition mit der Inhibition spezifischer „Pathways“ verknüpfen.

5 Summary

Despite multimodal therapy (surgery and radio(chemo)therapy), squamous cell carcinomas of the head and neck (HNSCC) often develop tumor recurrences and metastases, which respond inadequately to subsequent immune checkpoint inhibition.

The transmembrane protein PD-L1 ("programmed death-ligand 1") on the surface of tumor and immune cells plays a central role as a predictive biomarker and is involved in the modulation of the immune response through its binding to the PD-1 receptor on various immune cells.

The determination of PD-L1 expression in HNSCC is therefore of great diagnostic and clinical relevance. For this purpose, both the TPS ("tumor proportional score") and the CPS ("combined positivity score") scores were established, which quantitatively record either the PD-L1 expression of the tumor cells (TPS) or combined tumor and immune cells (CPS).

Therefore, the aim of this work was to determine the CPS score of an adjuvantly treated HNSCC patient cohort (n = 249) from the LMU Departments of Radiation Oncology and Otorhinolaryngology after immunohistochemical PD-L1 staining and to compare it with the TPS score regarding various aspects. In this context, the HPV status of the tumors, the prognostic value of both scores, the correlation with the underlying immune phenotypes, the heterogeneity of PD-L1 expression and the dynamics between primary and recurrent tumors has been considered.

In the patient groups examined, there was statistically a close link between the TPS and CPS scores (correlation coefficient 0.92), while in the median, HPV-positive HNSCC showed significantly higher TPS and CPS scores. It was noticeable that low TPS and CPS scores mostly showed the "cold" immune phenotype, whereas at the higher scores the "hot" immune phenotype predominates. This phenomenon was more evident for the CPS score, which includes tumor-associated immune cells.

Since the immunohistochemical evaluations were performed on tissue microarrays (TMA), the intratumoral heterogeneity of PD-L1 expression was determined using three different tumor cores of each tumor. In parallel, the presence of a heterogeneous PD-L1 expression on complete tumor sections was analyzed from 20 cases classified as homogeneous and heterogeneous based on TMA analysis to check the heterogeneity criterion. In 19 out of 20 cases the classification was confirmed. Further analysis of these data showed that heterogeneous PD-L1 expression in the tumor cells (TPS score) indicates an increased risk of recurrence after adjuvant radiochemotherapy when it occurs in conjunction with high PD-L1 expression (TPS score >50%) or in connection with a positive L status.

To determine the prognostic value of PD-L1 expression after adjuvant radio(chemo)therapy in detail, TPS and CPS scores were correlated with the clinical endpoint "freedom from recurrence". Various threshold values for TPS and CPS scores in the LMU cohort 2008-2013 were considered. The resulting risk groups were compared statistically (LogRank test) for each threshold using Kaplan-Meier curves. A threshold value for the TPS score < 1% and for the CPS score < 1 defined a high-risk group of patients (P<0.05) with regard to tumor recurrence after radiation (chemo)therapy. Thus, a small group (n = 5 patients) with very low PD-L1 expression and a "cold" immune phenotype showed a greatly increased risk for recurrence.

In a second step, a "risk score" was established for the remaining patients including TPS/CPS as continuous variables (interaction of TPS and CPS), T3/4 stage and extracapsular growth (ECE) in a multivariate model resulting in a high risk group of patients according to tumor recurrence after radiochemotherapy (p= 0,047).

In addition, a separate group of primary/recurrent tumor pairs was used to examine whether the immune phenotype and PD-L1 expression (TPS/CPS scores) change during recurrence formation. A change in the immune phenotype was found in 60% of tumor pairs. For the TPS score, there was a change in 80% of cases, whereas the CPS score changed in 95% of cases.

Summary

In summary, the comparison of TPS and CPS scores in an adjuvantly treated HNSCC cohort showed good agreement between the two scores of PD-L1 expression but had a different impact on research questions. While the TPS score had the greatest impact on the analysis of PD-L1 heterogeneity, the CPS score allowed clearer conclusions regarding HPV status and prognosis after standard-of-care therapy.

6 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) zeigen trotz multimodaler Therapie (Chirurgie und Radio(chemo)therapie) häufig Rezidive und Metastasen, die auch auf eine nachfolgende Immun-Checkpoint-Inhibition oftmals unzureichend ansprechen. Das Transmembranprotein PD-L1 („Programmed Death-Ligand 1“) auf der Oberfläche von Tumor- und Immunzellen spielt dabei als Biomarker eine zentrale Rolle und ist durch seine Bindung an den PD-1 Rezeptor auf verschiedenen Immunzellen an der Modulation der Immunantwort beteiligt. Die Bestimmung der PD-L1-Expression in HNSCC ist daher von großer diagnostischer und klinischer Relevanz. Hierfür wurde sowohl der TPS („Tumor Proportional Score“) und der CPS („Combined Positivity Score“) Score etabliert, der entweder die PD-L1-Expression der Tumorzellen (TPS) oder kombiniert von Tumor- und Immunzellen (CPS) quantitativ erfasst. Deshalb war es das übergeordnete Ziel dieser Arbeit anhand eines adjuvant behandelten HNSCC-Patientenkollektivs (n = 249) der Strahlenklinik und HNO-Klinik der LMU München nach einer immunhistochemischen PD-L1 Färbung den CPS-Score zu ermitteln und mit dem TPS-Score hinsichtlich verschiedener Gesichtspunkte zu vergleichen. Dabei sollte der HPV-Status der Tumore, die prognostische Aussagekraft beider „Scores“, die Korrelation mit den zugrundeliegenden Immunphänotypen, die Heterogenität der PD-L1-Expression sowie die Dynamik zwischen Primärtumor und Rezidiv berücksichtigt werden.

In den untersuchten Patientenkollektiven zeigte sich statistisch eine enge Verknüpfung zwischen TPS- und CPS-Score (Korrelationskoeffizient 0,92). HPV-positive HNSCC zeigten hier im Median signifikant höhere TPS- und CPS-Scores.

Auffällig war, dass niedrige TPS- und CPS-Scores zumeist den Immunphänotyp „cold“ aufwiesen und höhere „Scores“ vermehrt den Immunphänotyp „hot“. Diese Tendenz zeigte sich bei dem CPS-Score deutlicher, was auf die Berücksichtigung der Tumor-assoziierten Immunzellen zurückzuführen ist.

Da die immunhistochemische Auswertung auf Tissue-Micro-Arrays (TMA) erfolgte, wurde die intratumorale Heterogenität der PD-L1-Expression anhand von drei verschiedenen Tumorstanzien eines jeden Tumors bestimmt. Parallel dazu wurden von 20 als homogen/heterogen klassifizierten Fällen das Vorliegen einer heterogenen PD-L1-Expression auf kompletten Tumorschnitten analysiert, um durch diesen Vergleich das entwickelte Heterogenitätskriterium zu überprüfen. In 19 von 20 Fällen wurde die Klassifikation bestätigt. Die weitere Analyse dieser Daten zeigte, dass eine heterogene PD-L1-Expression in den Tumorzellen (TPS-Score) auf ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv nach einer adjuvanten Radiochemotherapie hindeutet, wenn sie in Verbindung mit einer hohen PD-L1-Expression (TPS-Score >50%) oder einem positiven L-Status auftritt.

Um den prognostischen Wert der PD-L1-Expression nach adjuvanter Radio(chemo)therapie im Detail zu bestimmen, wurden TPS- und CPS-Scores mit dem klinischen Endpunkt Rezidivfreiheit korreliert. Dabei wurden verschiedene Schwellwerte für TPS- und CPS-Score im LMU-Kollektiv 2008-2013 betrachtet. Die resultierenden Risikogruppen wurden anhand von Kaplan-Meier-Kurven für jeden Schwellwert statistisch (LogRank-Test) verglichen. Es ergaben sich signifikant ($P < 0,05$) unterschiedliche Patientengruppen hinsichtlich des Risikos für ein Tumorrezidiv nach Strahlen(chemo)therapie bei einem Schwellwert für den TPS-Score $< 1\%$ und für den CPS Score < 1 . Eine kleine Gruppe (n = 5 Patienten) mit sehr niedriger PD-L1-Expression und dem Immunphänotyp „cold“ zeigte demnach ein stark erhöhtes Rezidivrisiko.

Für die übrigen Patienten wurde in einem zweiten Schritt ein „Risk Score“ aus TPS/CPS, T3/4-Stadium und extrakapsulärem Wachstum (ECE) gebildet, welcher eine Gruppe mit einem signifikant höherem Rezidivrisiko anzeigte (p-Wert=0,047).

Zudem wurde anhand eines separaten Kollektivs aus Primärtumor-/Rezidivtumor-Paaren untersucht, ob sich Immunphänotyp, sowie PD-L1-Expression und damit TPS-/CPS-Score im Laufe der Rezidivbildung verändern. Es zeigte sich in dem vorliegenden Kollektiv eine Änderung des Immunphänotyps in 60% der Fälle. Beim TPS-Score kam es in 80% der Fälle zu einer Änderung der PD-L1-Expression, wohingegen dies beim CPS-Score in 95% der Fälle vorkam.

Der Vergleich von TPS- und CPS- Score in einem adjuvant behandelten HNSCC Kollektiv zeigte einerseits eine gute Übereinstimmung der beiden „Scores“ bei der Bestimmung der PD-L1-Expression, andererseits eine unterschiedliche Aussagekraft für die verschiedenen Fragestellungen. Während bei der Analyse der Heterogenität der TPS-Score die größte Bedeutung hat, lassen sich mit dem CPS-Score klarere Aussagen hinsichtlich HPV-Status und Prognose nach einer Standardtherapie treffen.

7 Anhang

Tabellen:

- Tabelle 3: klinische Daten der Kollektive
- Tabelle 4: Scoring-Ergebnisse der Kollektive

Tabelle 3: Klinische Daten der Kollektive (Fußnoten siehe Seite 70)

Rezidiv-Kollektiv																		
ID ¹	Ko ²	A ³	Lo ⁴	S ⁵	Ra ⁶	UICC ⁷	T ⁸	N ⁹	G ¹⁰	PNI ¹¹	LVI ¹²	VTI ¹³	ECE ¹⁴	R ¹⁵	C ¹⁶	HPV ¹⁷	RF ¹⁸	RF(d) ¹⁹
P001	R	48	OC	m	-	III	2	1	3	1	0	0	0	0	0	0	1	201
P002	R/08_13	68	HP	w	1	IVa	1	2	2	0	1	1	1	0	1	0	1	294
P003	R/08_13	51	OP	m	na	III	3	0	1	-	0	0	0	0	0	0	1	204
P004	R	60	OP	m	-	IVa	4	0	2	-	-	-	-	-	1	0	1	416
P005	R/13_16	58	OC	w	0	II	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	315
P006	R	60	LA	m	-	IVa	4	1	2	-	-	-	-	-	1	0	1	779
P007	R	55	OP	m	-	IVa	4	2	3	-	-	-	-	-	1	0	1	254
P008	R/08_13	47	OC	m	1	III	2	1	2	-	1	0	1	0	0	0	1	199
P009	R	69	HP	w	-	III	3	1	2	0	0	0	-	-	1	0	1	461
P010	R/13_16	47	OC	m	1	II	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	236
P011	R	64	OP	m	-	IVa	4	2	3	-	-	-	-	-	1	0	1	399
P012	R/13_16	60	HP	m	1	IVa	4	2	3	0	0	0	1	1	1	0	1	323
P013	R	55	OC	m	-	IVa	4	2	2	0	0	0	-	0	1	0	1	303
P014	R	60	OP	m	-	IVa	3	2	3	1	0	1	1	1	1	0	1	233
P015	R/08_13	53	OP	w	na	III	1	1	3	0	0	0	1	1	1	0	1	492
P016	R	66	OP	m	-	IVa	4	2	3	-	-	-	-	-	1	0	1	360
P034	R/08_13	58	OC	w	1	IVa	3	2	3	0	1	0	1	0	1	0	1	147
P035	R	87	LA	m	-	IVa	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	671
P036	R/13_16	55	LA	m	1	III	3	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	138
P038	R/13_16	63	OC	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	0	1	0	1	182

Anhang

LMU-KKG-Kollektiv 13_16																		
ID ¹	Ko ²	A ³	Lo ⁴	S ⁵	Ra ⁶	UICC ⁷	T ⁸	N ⁹	G ¹⁰	PNI ¹¹	LVI ¹²	VTI ¹³	ECE ¹⁴	R ¹⁵	C ¹⁶	HPV ¹⁷	RF ¹⁸	RF(d) ¹⁹
P037	13_16	74	OP	m	1	II	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	239
P039	13_16	55	OC	m	1	IVa	2	2	3	0	1	1	1	1	1	0	0	175
P040	13_16	55	OC	w	1	III	3	1	2	0	1	0	0	0	1	0	1	1205
P041	13_16	67	OP	w	0	IVa	2	2	3	0	0	0	0	1	1	1	0	1777
P042	13_16	55	OP	m	1	II	2	0	2	1	0	0	0	0	1	1	0	2072
P043	13_16	61	OP	m	1	III	2	1	3	0	0	0	0	0	1	1	1	805
P044	13_16	58	OC	w	1	II	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1502
P045	13_16	46	LA	m	1	IVa	3	2	3	1	0	0	1	1	1	0	1	405
P046	13_16	58	OP	m	1	IVb	4	3	2	0	1	0	0	0	0	0	0	2143
P047	13_16	63	OP	m	1	II	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1397
P048	13_16	48	OP	m	1	III	3	1	3	0	0	0	0	0	1	1	0	1533
P049	13_16	53	OP	w	1	IVa	3	2	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1006
P050	13_16	72	LA	m	1	IVa	2	2	3	0	1	0	0	1	1	0	0	1953
P051	13_16	70	OC	m	1	III	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2073
P052	13_16	52	OP	m	1	IVa	3	2	3	0	1	0	0	1	1	0	1	156
P053	13_16	53	OC	m	1	II	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	774
P054	13_16	46	OP	m	0	III	2	1	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1874
P055	13_16	55	OC	m	1	III	2	1	3	0	0	0	0	1	1	0	0	1809
P056	13_16	69	OP	m	0	III	2	1	3	0	1	0	1	0	1	1	0	2310
P057	13_16	51	OP	m	1	III	3	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1077
P058	13_16	75	HP	m	1	III	2	1	3	0	0	0	1	0	1	0	0	423
P059	13_16	58	OP	m	1	III	3	1	3	1	0	0	0	1	1	1	1	263
P060	13_16	66	OP	m	1	III	2	1	2	0	0	0	1	0	1	1	1	659
P061	13_16	71	OP	w	0	III	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1807
P062	13_16	59	OP	m	1	IVa	2	2	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1697

Anhang

ID ¹	Ko ²	A ³	Lo ⁴	S ⁵	Ra ⁶	UICC ⁷	T ⁸	N ⁹	G ¹⁰	PNI ¹¹	LVI ¹²	VTI ¹³	ECE ¹⁴	R ¹⁵	C ¹⁶	HPV ¹⁷	RF ¹⁸	RF(d) ¹⁹
P063	13_16	41	OC	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	0	1	0	0	1752
P064	13_16	62	OP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	1	0	1	1	0	1795
P065	13_16	62	OP	w	1	IVa	4	0	3	0	0	0	0	1	1	0	0	1808
P066	13_16	62	OP	m	1	III	3	na	3	0	0	0	-	0	0	1	0	930
P067	13_16	53	OP	w	1	IVa	3	2	3	1	1	0	1	0	1	0	0	1553
P068	13_16	70	OP	m	1	IVa	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	291
P069	13_16	65	OP	m	1	II	2	0	-	0	0	0	0	0	1	0	0	1257
P070	13_16	69	HP	m	1	IVa	4	1	3	0	1	0	0	0	1	0	1	171
P071	13_16	78	OP	m	1	IVa	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	297
P072	13_16	70	LA	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1641
P073	13_16	62	OP	w	1	IVa	4	1	3	0	0	0	0	0	1	0	0	2829
P074	13_16	50	LA	m	1	IVa	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1268
P075	13_16	57	HP	m	1	III	3	1	3	0	-	0	0	1	1	0	0	157
P076	13_16	56	OP	m	1	IVa	3	2	3	1	1	1	1	0	1	1	0	2730
P077	13_16	64	OP	m	1	IVa	2	2	3	0	1	0	0	0	1	0	0	1666
P078	13_16	61	OC	w	1	IVa	2	2	2	1	0	0	1	0	1	0	0	1384
P079	13_16	74	LA	m	1	III	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2122
P080	13_16	71	OP	m	1	IVa	2	2	2	0	0	0	0	0	1	1	0	2138
P081	13_16	83	OP	w	1	II	2	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1660
P082	13_16	43	OP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1970
P083	13_16	70	OP	w	1	IVa	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2627
P084	13_16	56	HP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	0	1	0	0	1981
P085	13_16	52	OP	m	1	IVa	4	2	3	0	1	0	0	0	1	0	0	505
P086	13_16	68	OP	m	1	III	1	1	3	0	1	0	0	0	1	1	0	2744
P087	13_16	47	LA	m	1	IVa	4	1	3	0	1	0	0	0	1	0	1	186
P088	13_16	61	LA	m	1	II	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1605

Anhang

ID ¹	Ko ²	A ³	Lo ⁴	S ⁵	Ra ⁶	UICC ⁷	T ⁸	N ⁹	G ¹⁰	PNI ¹¹	LVI ¹²	VTI ¹³	ECE ¹⁴	R ¹⁵	C ¹⁶	HPV ¹⁷	RF ¹⁸	RF(d) ¹⁹
P089	13_16	71	OP	w	na	III	2	1	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1361
P090	13_16	87	OC	w	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	1	0	0	0	1301
P091	13_16	49	OP	m	1	IVa	1	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1696
P092	13_16	69	OP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	1	0	1	1	0	2112
P093	13_16	75	HP	m	1	IVa	2	2	2	0	0	0	1	0	1	0	0	1864
P094	13_16	70	OP	m	1	IVa	1	2	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1862
P095	13_16	74	LA	m	1	III	3	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	751
P096	13_16	57	OP	m	1	III	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1940
P097	13_16	67	OP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	1	1	1	1	0	2217
P098	13_16	53	OC	w	1	III	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2227
P099	13_16	55	OP	w	1	III	3	0	3	0	0	0	0	0	1	1	0	2912
P100	13_16	70	OP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	0	1	0	0	1934
P101	13_16	64	OP	m	1	IVa	3	2	2	0	1	0	1	0	1	0	1	118
P102	13_16	69	OC	w	1	II	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	369
P103	13_16	42	OP	m	1	IVa	3	2	3	0	1	0	1	1	1	1	1	863
P104	13_16	47	OC	m	1	IVa	3	2	3	0	0	0	0	0	1	0	0	1993
P105	13_16	53	OP	m	1	IVb	4	3	-	1	1	0	1	0	1	0	0	150
P106	13_16	59	OC	m	1	III	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2747
P107	13_16	63	LA	m	1	IVa	4	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1543
P108	13_16	57	OP	m	1	III	2	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	586
P109	13_16	61	OC	m	1	II	2	0	3	1	0	0	0	0	1	0	0	1266
P110	13_16	59	LA	m	1	IVa	4	2	3	0	1	0	1	0	1	0	0	2136
P111	13_16	82	LA	m	1	III	2	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	1742
P112	13_16	66	OC	w	1	II	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2751
P113	13_16	49	OC	m	1	IVa	2	2	2	1	0	0	1	0	1	0	0	1330
P114	13_16	74	HP	m	na	III	1	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	2069

Anhang

ID ¹	Ko ²	A ³	Lo ⁴	S ⁵	Ra ⁶	UICC ⁷	T ⁸	N ⁹	G ¹⁰	PNI ¹¹	LVI ¹²	VTI ¹³	ECE ¹⁴	R ¹⁵	C ¹⁶	HPV ¹⁷	RF ¹⁸	RF(d) ¹⁹
P115	13_16	59	LA	m	1	III	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1688
P116	13_16	67	OC	w	1	III	2	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	1778
P117	13_16	61	HP	m	1	IVb	4	na	3	0	0	0	-	1	1	0	0	2591
P118	13_16	58	LA	m	1	IVa	4	2	3	0	1	0	1	1	1	0	1	259
P119	13_16	65	OC	m	1	III	2	1	2	1	1	0	1	0	0	0	1	258
P120	13_16	47	OC	w	1	IVa	2	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	2320
P121	13_16	65	OC	m	1	IVa	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2108
P122	13_16	62	OP	m	1	IVa	2	2	3	0	1	0	1	1	1	1	1	183
P123	13_16	73	LA	m	1	IVa	2	2	3	0	1	0	1	0	1	0	1	541
P124	13_16	66	LA	m	1	IVa	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	955
P125	13_16	59	OC	m	1	IVa	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1946
P126	13_16	61	OP	m	1	III	3	0	3	0	1	0	0	0	1	0	0	2496
P127	13_16	60	OP	m	1	II	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2556
P128	13_16	64	OP	w	0	III	1	1	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1714
P129	13_16	68	OP	w	1	III	3	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	2765
P130	13_16	73	HP	m	1	II	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2290
P131	13_16	69	OC	m	1	IVa	4	0	2	-	1	-	0	1	0	0	0	1801
P132	13_16	67	OP	m	1	II	2	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1576
P133	13_16	64	OP	m	1	IVa	3	2	3	1	0	0	1	0	1	0	0	2433
P134	13_16	66	LA	m	1	I	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2037
P135	13_16	61	OP	w	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	0	1	1	0	60
P136	13_16	57	OC	m	1	IVa	3	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	2726
P137	13_16	49	OP	m	1	IVa	1	2	2	-	1	-	1	0	1	0	1	282
P138	13_16	47	LA	m	1	IVa	4	2	3	0	1	0	0	1	1	0	0	470
P139	13_16	50	LA	m	1	IVa	4	2	3	0	1	0	1	0	1	0	1	154
P140	13_16	72	OP	m	na	II	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	87

Anhang

ID ¹	Ko ²	A ³	Lo ⁴	S ⁵	Ra ⁶	UICC ⁷	T ⁸	N ⁹	G ¹⁰	PNI ¹¹	LVI ¹²	VTI ¹³	ECE ¹⁴	R ¹⁵	C ¹⁶	HPV ¹⁷	RF ¹⁸	RF(d) ¹⁹
P141	13_16	62	LA	m	1	IVa	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2492
P142	13_16	62	LA	m	1	II	2	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	2185
P143	13_16	44	OC	m	1	II	2	na	3	0	0	0	-	0	0	0	1	184
P144	13_16	58	LA	w	1	II	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	218
P145	13_16	45	OC	m	1	III	2	1	2	0	0	0	1	0	1	0	0	1674
P146	13_16	67	OC	m	1	II	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	1557
P147	13_16	64	OP	m	1	III	2	1	3	0	0	1	1	0	0	1	0	2746
P148	13_16	66	OP	m	1	IVa	3	2	3	0	1	0	0	0	1	0	1	1505
P149	13_16	58	OC	m	1	IVa	4	1	3	0	1	0	0	0	1	1	0	2433
LMU-KKG-Kollektiv 08_13																		
ID	Ko	A	Lo	S	Ra	UICC	T	N	G	PNI	LVI	VTI	ECE	R	C	HPV	RF	RF(d)
P150	08_13	59	OC	m	1	IVa	4	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1	56
P151	08_13	64	OC	w	1	II	2	0	2	-	0	0	0	0	0	0	0	2563
P152	08_13	69	LA	m	1	IVa	4	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	1833
P153	08_13	61	HP	m	1	III	2	1	3	0	0	0	0	1	1	0	0	1682
P154	08_13	50	OC	w	1	III	1	1	2	-	0	0	0	0	0	0	0	2321
P155	08_13	63	HP	m	1	IVa	2	2	3	1	0	0	0	0	1	0	0	1100
P156	08_13	69	OP	m	1	III	1	1	2	-	0	0	0	0	0	0	0	2087
P157	08_13	79	LA	w	1	IVa	4	1	3	0	0	0	0	0	1	0	0	919
P158	08_13	68	LA	m	1	III	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1684
P159	08_13	62	OP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	0	0	1	0	884
P160	08_13	62	OC	m	1	IVa	4	2	2	-	-	0	0	1	1	0	0	484
P161	08_13	62	OP	w	na	IVa	2	2	3	0	1	0	0	0	0	1	0	1888
P162	08_13	71	HP	m	0	IVa	2	2	3	0	0	0	1	0	1	1	0	1394
P163	08_13	65	OC	m	0	IVa	3	2	3	-	-	-	0	0	1	0	1	772
P164	08_13	61	OP	m	1	III	2	1	3	-	0	0	1	0	1	0	0	1612

Anhang

ID ¹	Ko ²	A ³	Lo ⁴	S ⁵	Ra ⁶	UICC ⁷	T ⁸	N ⁹	G ¹⁰	PNI ¹¹	LVI ¹²	VTI ¹³	ECE ¹⁴	R ¹⁵	C ¹⁶	HPV ¹⁷	RF ¹⁸	RF(d) ¹⁹
P165	08_13	55	OP	m	1	III	2	1	3	-	-	-	0	0	0	1	0	2749
P166	08_13	60	HP	w	1	IVa	4	0	3	0	0	0	0	0	1	0	1	165
P167	08_13	49	OP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	1	1	1	0	1438
P168	08_13	49	OP	m	0	III	3	0	3	-	0	0	0	0	1	1	0	1282
P169	08_13	68	OC	w	1	III	3	0	2	-	0	0	0	0	0	0	0	1728
P170	08_13	66	HP	w	1	IVa	2	2	3	0	1	0	1	0	1	0	1	379
P171	08_13	61	OC	m	na	III	2	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1946
P172	08_13	40	OP	w	1	IVa	4	0	3	-	0	0	0	1	1	1	0	1226
P173	08_13	67	OP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	637
P174	08_13	81	OP	w	na	IVa	2	2	2	1	1	0	1	1	0	1	0	965
P175	08_13	51	OC	m	1	IVa	4	0	3	-	0	0	0	1	0	0	0	1660
P176	08_13	69	OP	w	1	IVa	1	2	2	0	0	0	1	0	1	0	0	120
P177	08_13	41	OC	m	1	IVa	4	0	3	1	0	0	0	0	1	0	1	680
P178	08_13	63	OP	w	1	IVa	1	2	2	0	1	0	1	0	1	0	0	308
P179	08_13	72	OP	m	na	IVa	2	2	3	0	0	0	1	0	1	0	1	228
P180	08_13	73	OP	w	na	IVa	1	2	3	0	1	0	0	0	0	1	0	2423
P181	08_13	77	OP	m	na	III	3	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1808
P182	08_13	54	OC	m	1	IVa	3	2	3	1	1	0	0	1	1	0	0	305
P183	08_13	62	OP	m	0	III	2	1	3	0	0	0	0	1	1	1	0	2538
P184	08_13	66	OP	w	1	IVa	3	2	2	1	0	0	1	0	1	0	1	438
P185	08_13	47	LA	m	1	III	3	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	2332
P186	08_13	72	OP	w	na	IVa	3	2	2	0	1	0	1	-	1	0	0	1564
P187	08_13	55	HP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	1	0	1	0	0	2656
P188	08_13	54	OC	m	1	IVa	3	2	2	-	0	0	0	1	0	0	0	1871
P189	08_13	64	OP	w	1	IVa	4	0	3	-	0	0	0	0	1	0	0	303
P190	08_13	65	OP	m	1	IVa	1	2	2	0	1	0	0	0	1	0	0	406

Anhang

ID ¹	Ko ²	A ³	Lo ⁴	S ⁵	Ra ⁶	UICC ⁷	T ⁸	N ⁹	G ¹⁰	PNI ¹¹	LVI ¹²	VTI ¹³	ECE ¹⁴	R ¹⁵	C ¹⁶	HPV ¹⁷	RF ¹⁸	RF(d) ¹⁹
P191	08_13	62	LA	m	na	IVa	4	2	3	0	0	0	0	0	1	0	1	226
P192	08_13	66	OC	w	1	IVa	4	0	2	1	-	-	0	1	1	0	1	203
P193	08_13	71	OP	m	1	II	2	0	3	-	-	-	0	0	0	0	0	2276
P194	08_13	59	OP	w	1	III	1	1	3	-	-	-	0	0	0	0	0	232
P195	08_13	48	HP	m	1	III	1	1	2	0	0	0	1	0	1	0	0	2598
P196	08_13	68	OC	w	0	II	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1418
P197	08_13	61	OP	m	1	IVa	3	2	3	1	1	0	1	1	1	0	0	2460
P198	08_13	65	OP	m	1	I	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2290
P199	08_13	69	OP	m	na	IVa	3	2	3	0	1	0	0	1	1	1	0	2103
P200	08_13	84	OP	w	na	IVa	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1925
P201	08_13	57	OC	w	1	IVa	3	2	2	-	-	-	1	0	1	0	0	1289
P202	08_13	60	OC	m	na	IVa	3	2	3	-	0	0	0	0	1	0	0	1024
P203	08_13	47	OC	m	0	IVa	4	0	3	-	0	0	0	0	1	1	0	981
P204	08_13	56	OP	m	na	IVa	3	2	3	0	1	0	0	0	1	0	1	387
P205	08_13	71	OP	w	na	III	2	1	2	1	0	0	0	1	1	0	0	2513
P206	08_13	59	HP	m	1	IVb	2	3	3	0	0	0	0	1	1	0	0	850
P207	08_13	51	OP	m	1	IVa	2	2	3	1	1	0	0	0	1	0	0	959
P208	08_13	51	LA	m	na	III	3	0	3	0	0	0	0	-	0	0	0	2073
P209	08_13	59	OP	w	0	IVa	1	2	3	0	1	0	0	0	1	1	0	2134
P210	08_13	48	OC	w	1	II	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2196
P211	08_13	57	HP	m	na	IVa	1	2	3	-	1	0	1	2	1	0	0	2138
P212	08_13	72	LA	m	1	III	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1466
P213	08_13	44	HP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	1	0	1	0	0	929
P214	08_13	59	OP	m	1	IVa	2	2	3	-	0	0	1	1	1	1	0	1466
P215	08_13	60	OP	m	1	III	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	503
P216	08_13	49	OP	m	1	IVa	3	2	3	0	0	0	1	0	1	1	0	1431

Anhang

ID ¹	Ko ²	A ³	Lo ⁴	S ⁵	Ra ⁶	UICC ⁷	T ⁸	N ⁹	G ¹⁰	PNI ¹¹	LVI ¹²	VTI ¹³	ECE ¹⁴	R ¹⁵	C ¹⁶	HPV ¹⁷	RF ¹⁸	RF(d) ¹⁹
P217	08_13	69	OP	m	1	IVa	3	2	3	0	0	0	0	0	1	0	0	2326
P218	08_13	62	OP	m	na	IVa	2	2	2	0	0	0	0	0	1	0	1	198
P219	08_13	63	OP	m	1	II	2	0	3	0	1	0	0	0	1	1	0	2075
P220	08_13	60	OC	m	1	IVa	2	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	1483
P221	08_13	68	OP	w	1	IVa	1	2	2	0	1	0	1	0	1	1	0	1121
P222	08_13	65	OC	w	na	III	2	1	3	0	0	0	0	-	0	0	0	1696
P223	08_13	20	OP	w	na	I	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	818
P224	08_13	53	OP	m	1	II	2	0	2	-	0	0	0	0	0	0	0	1604
P225	08_13	62	OC	m	na	III	3	1	1	-	0	0	0	0	1	0	0	2590
P226	08_13	75	LA	m	1	IVa	3	2	3	0	0	0	0	0	1	0	0	451
P227	08_13	66	OP	w	1	IVa	1	2	3	-	1	-	1	1	1	1	0	1396
P228	08_13	61	OP	m	na	IVa	2	2	3	0	0	0	0	0	1	1	0	2139
P229	08_13	54	HP	w	1	IVa	2	2	2	1	1	0	1	0	1	0	1	1153
P230	08_13	50	LA	w	1	III	3	1	2	0	1	0	0	0	1	0	0	906
P231	08_13	69	OC	m	1	IVa	3	2	3	1	0	0	1	0	1	0	0	444
P232	08_13	58	OP	m	1	II	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2465
P233	08_13	71	OC	m	na	IVa	1	2	2	-	-	-	0	0	0	0	0	1570
P234	08_13	50	LA	m	1	III	3	0	1	-	0	0	0	1	1	0	0	332
P235	08_13	67	OP	m	1	IVa	2	2	3	-	0	0	1	1	1	0	0	1766
P236	08_13	51	HP	m	1	IVb	2	3	3	0	0	0	1	0	1	0	0	595
P237	08_13	71	OC	m	1	III	3	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	2285
P238	08_13	58	OC	m	1	III	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	2227
P239	08_13	55	OP	w	1	III	2	1	3	0	0	0	0	0	1	0	0	819
P240	08_13	53	OP	m	na	II	2	0	2	1	0	0	0	1	1	1	0	1885
P241	08_13	72	OP	w	na	IVa	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1003
P242	08_13	68	HP	m	1	IVa	2	2	3	0	1	0	0	0	1	0	0	1000

Anhang

ID ¹	Ko ²	A ³	Lo ⁴	S ⁵	Ra ⁶	UICC ⁷	T ⁸	N ⁹	G ¹⁰	PNI ¹¹	LVI ¹²	VTI ¹³	ECE ¹⁴	R ¹⁵	C ¹⁶	HPV ¹⁷	RF ¹⁸	RF(d) ¹⁹
P243	08_13	67	OP	m	1	IVa	4	0	3	-	-	-	0	0	0	0	0	395
P244	08_13	84	OP	m	na	III	2	1	3	-	0	0	1	1	0	0	0	1571
P245	08_13	64	OC	w	0	III	1	1	2	-	0	0	-	0	1	0	0	2492
P246	08_13	76	OP	m	1	III	2	1	2	0	0	0	1	0	1	0	0	581
P247	08_13	50	OC	m	1	IVa	3	2	2	1	1	0	1	0	1	0	1	125
P248	08_13	68	OP	m	1	II	2	0	3	0	0	0	0	1	1	0	0	2306
P249	08_13	59	OP	m	na	IVa	1	2	3	0	0	0	0	0	1	1	0	2036
P250	08_13	59	LA	m	na	III	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1966
P251	08_13	62	LA	m	1	II	2	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1	1269
P252	08_13	62	OP	m	1	III	3	1	3	-	-	1	0	1	1	0	0	1680
P253	08_13	69	LA	m	na	IVa	4	2	3	1	1	0	1	0	1	0	0	242
P254	08_13	48	HP	w	0	IVa	4	1	3	-	-	-	0	1	1	0	1	708
P255	08_13	47	OC	m	na	III	3	0	2	1	0	0	0	0	0	1	0	2165
P256	08_13	67	HP	m	1	IVb	4	1	3	0	0	0	0	1	1	0	0	785
P257	08_13	60	HP	m	1	IVa	3	2	2	0	1	0	1	1	1	0	1	467
P263	FB	55	OP	m	1	III	1	1	3	0	1	0	0	1	0	1	0	512
P264	FB	66	OP	w	1	IVa	2	2	2	1	1	0	1	0	1	0	1	824
P265	FB	60	HP	m	1	IVa	3	2	3	0	1	0	1	1	0	0	na	-
P266	FB	71	HP	m	1	IVb	4	3	3	0	0	0	1	0	1	0	1	173
P267	FB	75	OP	m	1	IVa	3	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	1632
P268	FB	52	OP	m	1	IVa	2	2	3	1	1	0	1	0	0	1	na	-
P269	FB	80	LA	m	1	IVa	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	995
P270	FB	74	OP	w	1	IVa	3	2	3	1	1	0	0	0	na	1	na	-
P271	FB	64	OP	m	1	IVa	2	2	3	0	1	0	0	0	0	1	na	-
P272	FB	59	OP	w	1	IVa	1	2	3	1	1	1	0	0	0	0	1	239
P273	FB	54	OP	m	1	IVa	3	2	3	0	1	0	0	0	0	1	0	1375

Anhang

ID ¹	Ko ²	A ³	Lo ⁴	S ⁵	Ra ⁶	UICC ⁷	T ⁸	N ⁹	G ¹⁰	PNI ¹¹	LVI ¹²	VTI ¹³	ECE ¹⁴	R ¹⁵	C ¹⁶	HPV ¹⁷	RF ¹⁸	RF(d) ¹⁹
P274	FB	58	LA	m	1	IVa	3	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	174
P275	FB	57	HP	m	1	IVa	2	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	377
P276	FB	78	OP	m	1	IVa	3	2	2	0	0	0	0	0	na	1	0	1409
P277	FB	71	OP	m	1	IVa	3	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1042
P278	FB	53	OP	w	1	IVa	3	2	3	-	-	-	0	-	na	1	na	-
P279	FB	64	OP	w	1	IVa	4	2	3	0	0	0	1	0	0	0	0	731
P280	FB	66	OP	m	1	III	3	1	3	1	1	0	0	0	0	0	1	407
P281	FB	61	OP	m	1	IVa	3	2	3	1	1	0	0	0	1	0	1	191
P282	FB	57	OP	m	1	IVb	1	3	3	0	1	0	0	0	1	1	0	1787

¹ ID= Patienten-Identifikationsnummer

² Ko= Kollektiv (R= Rezidiv, R/08_13 und R/13_16= Fälle, die sowohl in Rezidiv- wie auch 08-13-bzw 13-16-Kollektiv enthalten sind, FB= prospektives Full Bio-Kollektiv).

³ A= Alter in Jahren

⁴ Lo= Lokalisation (HP= Hypopharynx, LA= Larynx, OC= Oral Cavity/Mundhöhle, OP= Oropharynx)

⁵ S=Geschlecht (Sex)

⁶ Ra=Raucher (1= ja, 0= nein)

⁷ UICC=Tumorstadium nach UICC

⁸ T=T-Stadium nach UICC/TNM-Klassifikation, 7. Auflage

⁹ N=N-Status nach UICC/TNM-Klassifikation, 7. Auflage

¹⁰ G=Grading(Tumor-Differenzierungsgrad 1-3)

¹¹ PNI=Perineuralscheideninfiltration (1= ja, 0= nein)

¹² LVI= Lymphgefäßinfiltration (1= ja, 0= nein)

¹³ VTI=Venöse Gefäßinfiltration (1=ja, 0= nein)

¹⁴ ECE= Extrakapsuläres Wachstum (1=ja, 0= nein)

¹⁵ R=Resektionsstatus(R-Stadium, R0-R2)

¹⁶ C=Chemotherapie (1=ja, 0= nein)

¹⁷ HPV= HPV-Status (1= HPV-positiv, 0= HPV-negativ)

¹⁸ RF= Recurrence free (Rezidivfreiheit)

¹⁹ RF(d)= Recurrence free (Rezidivfreiheit in Tagen)

Tabelle 4: Scoring-Ergebnisse der Kollektive (Fußnoten siehe Seite 81)

Rezidiv-Kollektiv																			
ID ¹	Ko ²	TP1 ³	TP2 ⁴	TP3 ⁵	CP1 ⁶	CP2 ⁷	CP3 ⁸	I1 ⁹	I2 ¹⁰	I3 ¹¹	IS ¹²	TPh ¹³	CPh ¹⁴	TPP ¹⁵	CPP ¹⁶	IP ¹⁷	TPR ¹⁸	CPR ¹⁹	IR ²⁰
P001	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75	82	H	75	85	I
P002	R/08_13	5	20	10	27	21	3	C	C	C	C	het	hom*	3	9	C	20	76	I
P003	R/08_13	40	60	40	47	79	18	I	E	E	E	hom	hom*	25	49	E	10	25	C
P004	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	21	I	20	29	C
P005	R/13_16	2	1	1	4	12	3	na	na	na	na	hom	het	15	43	E	5	9	C
P006	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	45	C	1	6	C
P007	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	17	C	0	0	C
P008	R/08_13	5	30	25	5	15	29	C	C	C	C	het	het	20	22	E	20	31	I
P009	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	13	C	20	32	E
P010	R/13_16	20	20	5	20	11	17	na	na	na	na	het	hom	35	66	E	10	14	E
P011	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	30	I	15	28	C
P012	R/13_16	0	0	0	0	0	0	C	C	C	C	het	het	0	0	C	25	43	I/H
P013	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	41	I	85	110	I
P014	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	28	I	25	36	C
P015	R/08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	85	104	E	10	26	I
P016	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	15	I	20	32	I
P034	R/08_13	0	2	0	0	5	0	C	C	C	C	het	het	0	0	E	0	0	C
P035	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	36	C	15	17	C
P036	R/13_16	5	5	5	11	7	12	I	C	I	I	hom	hom	2	25	E	39	52	I
P038	R/13_16	80	95	95	76	96	95	C	I	C	C	het	het	95	98	E	85	88	C/I

LMU-KKG-Kollektiv 13_16

ID¹	Ko²	TP1³	TP2⁴	TP3⁵	CP1⁶	CP2⁷	CP3⁸	I1⁹	I2¹⁰	I3¹¹	IS¹²	TPh¹³	CPh¹⁴	TPP¹⁵	CPP¹⁶	IP¹⁷	TPR¹⁸	CPR¹⁹	IR²⁰
P037	13_16	60	70	50	78	80	67	I	H	na	?	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P039	13_16	1	1	15	4	4	7	I	C	C	C	het	het*	-	-	-	-	-	-
P040	13_16	0	0	0	0	0	0	I	C	I	I	het	het	-	-	-	-	-	-
P041	13_16	5	1	5	8	11	24	na	na	na	na	het	het	-	-	-	-	-	-
P042	13_16	20	25	15	22	15	22	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P043	13_16	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P044	13_16	10	1	1	32	12	14	E	I	E	E	het	het	-	-	-	-	-	-
P045	13_16	15	30	0	29	11	21	C	E	I	-	het	hom	-	-	-	-	-	-
P046	13_16	15	10	15	30	12	24	I	na	na	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P047	13_16	10	5	3	32	5	2	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P048	13_16	10	10	15	8	39	25	I	E	H	-	hom	het	-	-	-	-	-	-
P049	13_16	40	20	30	82	38	24	H	H	na	H	hom	het	-	-	-	-	-	-
P050	13_16	0	0	0	-	-	-	I	I	I	I	het	-	-	-	-	-	-	-
P051	13_16	10	5	5	6	8	3	E	E	E	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P052	13_16	20	5	5	7	9	2	I	I	I	I	het	het	-	-	-	-	-	-
P053	13_16	5	30	15	4	31	24	I	E	E	E	het	het	-	-	-	-	-	-
P054	13_16	30	30	60	43	72	83	H	E	H	H	hom	hom*	-	-	-	-	-	-
P055	13_16	81	76	65	83	70	75	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P056	13_16	40	50	35	43	49	61	H	H	H	H	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P057	13_16	0	0	2	0	0	10	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P058	13_16	40	25	30	27	50	63	I	I	H	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P059	13_16	5	5	5	16	9	15	na	na	na	na	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P060	13_16	10	15	25	10	19	35	na	na	na	na	hom	het	-	-	-	-	-	-
P061	13_16	90	85	70	82	89	76	na	na	na	na	het	hom	-	-	-	-	-	-
P062	13_16	8	5	5	13	9	16	na	na	na	na	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P063	13_16	90	80	85	100	80	91	I	i	I	I	hom	het	-	-	-	-	-	-
P064	13_16	25	20	35	43	53	23	na	H	H	H	hom	hom	-	-	-	-	-	-

Anhang

ID ¹	Ko ²	TP1 ³	TP2 ⁴	TP3 ⁵	CP1 ⁶	CP2 ⁷	CP3 ⁸	I1 ⁹	I2 ¹⁰	I3 ¹¹	IS ¹²	TPH ¹³	CPh ¹⁴	TPP ¹⁵	CPP ¹⁶	IP ¹⁷	TPR ¹⁸	CPR ¹⁹	IR ²⁰
P065	13_16	10	8	2	32	27	4	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P066	13_16	72	80	75	87	90	78	C	C	C	C	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P067	13_16	5	1	5	3	5	2	C	C	C	C	het	hom	-	-	-	-	-	-
P068	13_16	-	30	-	-	42	-	C	na	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
P069	13_16	5	10	8	12	24	5	E	E	C	E	hom	het	-	-	-	-	-	-
P070	13_16	2	1	5	6	12	9	I	I	I	I	het	hom	-	-	-	-	-	-
P071	13_16	95	95	90	86	98	95	I	I	I	I	hom	hom*	-	-	-	-	-	-
P072	13_16	50	40	40	31	52	53	H	H	H	H	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P073	13_16	95	95	95	99	100	87	E	E	I	E	hom	het	-	-	-	-	-	-
P074	13_16	20	2	0	25	4	-	C	C	C	C	het	-	-	-	-	-	-	-
P075	13_16	3	3	2	4	7	5	C	C	C	C	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P076	13_16	30	50	25	27	39	23	E	E	I	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P077	13_16	5	5	10	4	26	23	C	C	E	C	hom	het	-	-	-	-	-	-
P078	13_16	-	5	20	-	16	19	na	I	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P079	13_16	3	3	5	13	39	24	I	I	I	I	hom	het	-	-	-	-	-	-
P080	13_16	60	60	60	57	72	79	I	E	E	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P081	13_16	10	10	20	8	19	23	C	C	C	C	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P082	13_16	2	4	1	11	32	8	I	I	I	I	het	het	-	-	-	-	-	-
P083	13_16	5	-	-	21	-	-	I	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P084	13_16	70	70	70	83	80	74	H	H	I	H	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P085	13_16	8	8	8	12	17	46	C	C	C	C	hom	het	-	-	-	-	-	-
P086	13_16	20	20	10	22	17	12	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P087	13_16	5	5	5	5	7	3	C	C	C	C	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P088	13_16	10	10	10	29	7	18	C	C	C	C	hom	het	-	-	-	-	-	-
P089	13_16	100	100	100	100	100	100	-	I	I	I	het	hom	-	-	-	-	-	-
P090	13_16	60	80	90	90	82	79	I	I	i	I	het	hom	-	-	-	-	-	-
P091	13_16	80	80	90	91	76	78	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P092	13_16	70	60	80	73	92	65	I	I	I	I	hom	het	-	-	-	-	-	-

Anhang

ID ¹	Ko ²	TP1 ³	TP2 ⁴	TP3 ⁵	CP1 ⁶	CP2 ⁷	CP3 ⁸	I1 ⁹	I2 ¹⁰	I3 ¹¹	IS ¹²	TPh ¹³	CPh ¹⁴	TPP ¹⁵	CPP ¹⁶	IP ¹⁷	TPR ¹⁸	CPR ¹⁹	IR ²⁰
P093	13_16	15	15	15	28	24	27	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P094	13_16	15	15	-	19	21	-	C	C	na	C	-	-	-	-	-	-	-	-
P095	13_16	10	5	10	16	7	8	C	C	C	C	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P096	13_16	5	10	5	14	19	12	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P097	13_16	0	0	0	0	0	0	na	na	na	na	het	het	-	-	-	-	-	-
P098	13_16	70	100	100	98	83	85	na	I	I	I	het	het	-	-	-	-	-	-
P099	13_16	10	20	15	18	21	36	E	I	E	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P100	13_16	10	-	20	11	-	15	E	na	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P101	13_16	3	2	1	5	4	4	I	I	na	I	het	hom	-	-	-	-	-	-
P102	13_16	20	20	20	22	22	29	I	I	i	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P103	13_16	15	15	15	13	12	9	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P104	13_16	100	100	100	100	97	100	H	H	H	H	het	hom	-	-	-	-	-	-
P105	13_16	1	1	0	3	2	0	E	E	E	E	het	het	-	-	-	-	-	-
P106	13_16	5	5	5	19	21	12	E	E	E	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P107	13_16	30	30	50	24	28	62	I	I	I	I	hom	hom*	-	-	-	-	-	-
P108	13_16	0	1	-	0	3	-	C	C	na	C	-	-	-	-	-	-	-	-
P109	13_16	3	1	5	5	3	2	I	I	I	I	het	hom	-	-	-	-	-	-
P110	13_16	5	10	10	13	16	24	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P111	13_16	80	-	-	89	-	-	I	na	na	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P112	13_16	5	10	10	17	15	14	E	E	E	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P113	13_16	0	1	1	0	3	6	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P114	13_16	10	10	5	32	18	11	I	I	C	I	hom	het*	-	-	-	-	-	-
P115	13_16	3	1	0	2	4	0	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P116	13_16	90	90	90	92	100	96	I	I	E	I	hom	het	-	-	-	-	-	-
P117	13_16	90	80	100	92	96	83	C	na	na	na	het	het	-	-	-	-	-	-
P118	13_16	0	0	0	-	-	-	na	na	na	na	het	-	-	-	-	-	-	-
P119	13_16	3	1	1	17	11	12	C	C	C	C	het	hom	-	-	-	-	-	-
P120	13_16	70	70	50	79	81	43	I	E	I	I	hom	het	-	-	-	-	-	-

Anhang

ID ¹	Ko ²	TP1 ³	TP2 ⁴	TP3 ⁵	CP1 ⁶	CP2 ⁷	CP3 ⁸	I1 ⁹	I2 ¹⁰	I3 ¹¹	IS ¹²	TPH ¹³	CPh ¹⁴	TPP ¹⁵	CPP ¹⁶	IP ¹⁷	TPR ¹⁸	CPR ¹⁹	IR ²⁰
P121	13_16	20	20	25	41	42	39	C	C	I	C	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P122	13_16	30	40	30	37	34	48	I	E	E	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P123	13_16	80	80	80	93	80	74	H	H	H	H	hom	hom*	-	-	-	-	-	-
P124	13_16	5	1	3	9	8	3	C	C	C	C	het	hom	-	-	-	-	-	-
P125	13_16	-	-	1	-	-	5	na	na	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P126	13_16	40	5	0	5	4	7	C	C	C	C	het	het*	-	-	-	-	-	-
P127	13_16	10	5	1	21	16	1	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P128	13_16	10	15	20	13	22	18	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P129	13_16	1	2	2	5	3	9	I	C	E	-	hom	het	-	-	-	-	-	-
P130	13_16	-	1	1	-	4	5	na	I	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P131	13_16	15	15	5	11	8	6	C	C	C	C	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P132	13_16	70	70	80	91	89	61	H	H	H	H	hom	hom*	-	-	-	-	-	-
P133	13_16	0	0	1	0	0	4	na	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P134	13_16	30	10	30	27	14	13	na	na	na	na	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P135	13_16	0	3	3	0	9	7	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P136	13_16	5	1	2	23	13	12	I	I	I	i	het	hom	-	-	-	-	-	-
P137	13_16	0	0	0	0	0	0	na	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P138	13_16	15	10	10	49	47	39	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P139	13_16	0	0	0	0	0	0	I	I	I	I	het	het	-	-	-	-	-	-
P140	13_16	0	0	-	0	0	-	na	C	na	C	-	-	-	-	-	-	-	-
P141	13_16	2	0	1	4	0	2	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P142	13_16	20	50	30	51	53	49	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P143	13_16	80	60	80	77	75	88	na	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P144	13_16	70	50	70	89	64	86	I	na	I	I	hom	het	-	-	-	-	-	-
P145	13_16	5	5	10	9	9	11	E	E	I	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P146	13_16	80	80	80	73	76	81	O	E	O	O	hom	hom*	-	-	-	-	-	-
P147	13_16	15	15	15	10	13	11	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P148	13_16	1	0	0	6	0	0	E	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-

Anhang

ID ¹	Ko ²	TP1 ³	TP2 ⁴	TP3 ⁵	CP1 ⁶	CP2 ⁷	CP3 ⁸	I1 ⁹	I2 ¹⁰	I3 ¹¹	IS ¹²	TPh ¹³	CPh ¹⁴	TPP ¹⁵	CPP ¹⁶	IP ¹⁷	TPR ¹⁸	CPR ¹⁹	IR ²⁰
P149	13_16	20	20	50	74	71	69	E	E	E	E	het	hom	-	-	-	-	-	-
LMU-KKG-Kollektiv 08_13																			
ID	Ko	TP1	TP2	TP3	CP1	CP2	CP3	I1	I2	I3	IS	TPh	CPh	TPP	CPP	IP	TPR	CPR	IR
P150	08_13	10	25	20	21	26	14	C	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P151	08_13	60	69	73	75	58	71	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P152	08_13	85	60	80	48	68	86	I	I	I	I	het	hom*	-	-	-	-	-	-
P153	08_13	10	10	5	7	14	12	I	C	C	C	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P154	08_13	-	10	5	-	18	11	na	E	E	E	-	-	-	-	-	-	-	-
P155	08_13	5	3	2	4	11	6	I	E	I	I	hom	hom*	-	-	-	-	-	-
P156	08_13	10	-	-	8	-	-	I	na	na	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P157	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P158	08_13	-	-	15	-	-	18	na	na	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P159	08_13	30	90	-	45	98	-	H	H	na	H	-	-	-	-	-	-	-	-
P160	08_13	0	0	0	0	0	0	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P161	08_13	10	8	3	26	35	6	E	E	E	E	het	het	-	-	-	-	-	-
P162	08_13	95	89	99	83	91	98	E	E	E	E	het	het	-	-	-	-	-	-
P163	08_13	0	0	0	0	0	0	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P164	08_13	30	40	25	16	78	37	E	E	E	E	hom	hom*	-	-	-	-	-	-
P165	08_13	-	-	-	-	-	-	na	I	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P166	08_13	0	1	1	0	3	2	I	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P167	08_13	10	15	40	81	62	40	E	E	E	E	het	het	-	-	-	-	-	-
P168	08_13	4	8	3	36	9	16	I	I	I	I	het	het	-	-	-	-	-	-
P169	08_13	10	1	1	39	19	24	C	C	C	C	het	hom	-	-	-	-	-	-
P170	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P171	08_13	0	2	-	0	16	-	C	C	na	C	-	-	-	-	-	-	-	-
P172	08_13	35	30	20	43	41	32	I	E	E	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P173	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P174	08_13	10	15	25	41	37	81	I	E	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-

Anhang

ID ¹	Ko ²	TP1 ³	TP2 ⁴	TP3 ⁵	CP1 ⁶	CP2 ⁷	CP3 ⁸	I1 ⁹	I2 ¹⁰	I3 ¹¹	IS ¹²	TPH ¹³	CPh ¹⁴	TPP ¹⁵	CPP ¹⁶	IP ¹⁷	TPR ¹⁸	CPR ¹⁹	IR ²⁰
P175	08_13	5	15	10	4	34	15	I	I	I	I	het	het	-	-	-	-	-	-
P176	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P177	08_13	3	2	5	19	13	24	C	C	C	C	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P178	08_13	1	5	2	10	6	18	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P179	08_13	5	10	15	5	16	27	C	I	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P180	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P181	08_13	25	100	-	32	99	-	I	na	na	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P182	08_13	5	5	15	16	11	8	C	C	C	C	het	hom	-	-	-	-	-	-
P183	08_13	20	25	15	43	35	42	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P184	08_13	60	90	60	80	83	75	C	I	I	I	het	hom	-	-	-	-	-	-
P185	08_13	8	35	5	9	61	7	I	I	I	I	het	het	-	-	-	-	-	-
P186	08_13	35	15	25	51	15	33	I	I	I	I	hom	het	-	-	-	-	-	-
P187	08_13	35	-	35	43	-	81	I	na	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P188	08_13	1	2	4	24	6	6	-	I	C	-	het	het	-	-	-	-	-	-
P189	08_13	15	-	20	27	-	20	I	I	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P190	08_13	20	-	0	26	-	0	E	na	E	E	-	-	-	-	-	-	-	-
P191	08_13	-	-	-	-	-	-	I	I	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P192	08_13	70	70	80	57	73	90	I	I	C	I	hom	hom*	-	-	-	-	-	-
P193	08_13	40	50	50	81	84	91	E	E	E	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P194	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P195	08_13	15	20	-	31	36	-	C	C	na	C	-	-	-	-	-	-	-	-
P196	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	E	E	-	-	-	-	-	-	-	-
P197	08_13	-	40	10	-	71	38	na	E	E	E	-	-	-	-	-	-	-	-
P198	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P199	08_13	10	8	-	24	7	-	E	E	na	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P200	08_13	7	50	-	42	23	-	I	I	na	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P201	08_13	5	10	35	17	13	25	I	I	E	I	het	het*	-	-	-	-	-	-
P202	08_13	37	40	48	53	44	42	C	C	E	C	hom	hom	-	-	-	-	-	-

Anhang

ID ¹	Ko ²	TP1 ³	TP2 ⁴	TP3 ⁵	CP1 ⁶	CP2 ⁷	CP3 ⁸	I1 ⁹	I2 ¹⁰	I3 ¹¹	IS ¹²	TPH ¹³	CPh ¹⁴	TPP ¹⁵	CPP ¹⁶	IP ¹⁷	TPR ¹⁸	CPR ¹⁹	IR ²⁰
P203	08_13	10	15	10	42	51	29	I	I	E	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P204	08_13	90	40	20	72	59	18	I	I	H	I	het	het	-	-	-	-	-	-
P205	08_13	-	30	20	-	31	27	na	E	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P206	08_13	-	-	0	-	-	0	na	na	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P207	08_13	70	90	90	87	82	85	H	H	H	H	het	hom	-	-	-	-	-	-
P208	08_13	-	-	20	-	-	18	I	E	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P209	08_13	2	2	-	47	27	-	E	I	na	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P210	08_13	40	40	50	43	34	43	I	E	E	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P211	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P212	08_13	5	5	8	16	11	13	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P213	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P214	08_13	20	45	40	37	56	29	E	E	I	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P215	08_13	7	-	-	24	-	-	I	na	na	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P216	08_13	-	94	88	-	100	98	na	I	H	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P217	08_13	10	5	5	20	11	12	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P218	08_13	0	0	0	0	0	0	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P219	08_13	30	60	75	25	88	87	H	H	H	H	het	het	-	-	-	-	-	-
P220	08_13	20	50	25	31	46	50	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P221	08_13	40	70	-	69	87	-	I	I	na	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P222	08_13	5	10	15	17	18	26	I	I	H	I	het	hom	-	-	-	-	-	-
P223	08_13	5	10	15	5	10	8	C	I	I	I	het	het*	-	-	-	-	-	-
P224	08_13	0	0	0	0	0	0	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P225	08_13	0	1	0	0	2	-	C	C	C	C	het	-	-	-	-	-	-	-
P226	08_13	5	50	30	39	44	12	I	na	I	I	het	hom*	-	-	-	-	-	-
P227	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P228	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P229	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P230	08_13	-	-	-	-	-	-	E	na	na	E	-	-	-	-	-	-	-	-

Anhang

ID ¹	Ko ²	TP1 ³	TP2 ⁴	TP3 ⁵	CP1 ⁶	CP2 ⁷	CP3 ⁸	I1 ⁹	I2 ¹⁰	I3 ¹¹	IS ¹²	TPH ¹³	CPh ¹⁴	TPP ¹⁵	CPP ¹⁶	IP ¹⁷	TPR ¹⁸	CPR ¹⁹	IR ²⁰
P231	08_13	30	25	25	46	43	41	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P232	08_13	6	8	7	7	7	14	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P233	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P234	08_13	-	5	2	-	31	9	na	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
P235	08_13	10	15	15	42	11	25	E	E	E	E	hom	hom*	-	-	-	-	-	-
P236	08_13	10	-	10	14	-	19	I	na	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P237	08_13	3	20	20	2	7	31	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P238	08_13	3	10	10	25	24	23	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P239	08_13	15	-	-	10	-	-	I	na	na	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P240	08_13	15	10	15	23	21	17	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P241	08_13	90	80	90	100	64	97	C	C	C	C	hom	het	-	-	-	-	-	-
P242	08_13	5	3	5	11	7	12	I	I	I	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P243	08_13	0	0	1	0	0	5	C	C	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P244	08_13	85	90	90	44	91	89	H	H	H	H	hom	hom*	-	-	-	-	-	-
P245	08_13	20	25	40	31	19	25	I	I	E	I	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P246	08_13	60	60	8	49	50	20	E	E	I	E	het	hom	-	-	-	-	-	-
P247	08_13	0	0	0	0	0	0	C	E	C	C	het	het	-	-	-	-	-	-
P248	08_13	15	15	25	14	29	31	I	na	C	-	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P249	08_13	-	-	20	-	-	3	na	na	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-
P250	08_13	15	-	-	5	-	-	C	na	na	C	-	-	-	-	-	-	-	-
P251	08_13	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-
P252	08_13	4	2	5	2	7	24	C	C	C	C	hom	het	-	-	-	-	-	-
P253	08_13	20	15	15	24	19	21	E	E	I	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P254	08_13	-	5	5	2	9	13	C	C	C	C	-	het	-	-	-	-	-	-
P255	08_13	5	5	-	11	20	-	C	C	na	C	-	-	-	-	-	-	-	-
P256	08_13	10	5	8	15	42	31	E	E	E	E	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P257	08_13	1	1	1	8	6	2	C	C	C	C	hom	het	-	-	-	-	-	-
P263	FB	40	40	90	43	40	87	-	-	-	-	het	het	-	-	-	-	-	-

Anhang

ID ¹	Ko ²	TP1 ³	TP2 ⁴	TP3 ⁵	CP1 ⁶	CP2 ⁷	CP3 ⁸	I1 ⁹	I2 ¹⁰	I3 ¹¹	IS ¹²	TPh ¹³	CPh ¹⁴	TPP ¹⁵	CPP ¹⁶	IP ¹⁷	TPR ¹⁸	CPR ¹⁹	IR ²⁰
P264	FB	10	5	5	6	8	7	-	-	-	-	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P265	FB	3	0	0	1	0	0	-	-	-	-	het	het	-	-	-	-	-	-
P266	FB	70	70	80	68	75	79	-	-	-	-	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P267	FB	30	30	50	28	24	61	-	-	-	-	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P268	FB	1	1	3	1	1	5	-	-	-	-	het	het	-	-	-	-	-	-
P269	FB	25	-	-	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P270	FB	60	75	80	56	70	73	-	-	-	-	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P271	FB	15	10	5	12	12	8	-	-	-	-	het	hom	-	-	-	-	-	-
P272	FB	10	25	10	9	22	8	-	-	-	-	het	het	-	-	-	-	-	-
P273	FB	100	100	80	97	98	89	-	-	-	-	het	het	-	-	-	-	-	-
P274	FB	0	0	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P275	FB	-	5	2	-	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P276	FB	20	2	5	19	1	5	-	-	-	-	het	het	-	-	-	-	-	-
P277	FB	4	2	5	3	1	4	-	-	-	-	hom	het	-	-	-	-	-	-
P278	FB	30	30	25	36	33	21	-	-	-	-	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P279	FB	100	100	95	99	97	89	-	-	-	-	het	het	-	-	-	-	-	-

Anhang

ID ¹	Ko ²	TP1 ³	TP2 ⁴	TP3 ⁵	CP1 ⁶	CP2 ⁷	CP3 ⁸	I1 ⁹	I2 ¹⁰	I3 ¹¹	IS ¹²	TPh ¹³	CPh ¹⁴	TPP ¹⁵	CPP ¹⁶	IP ¹⁷	TPR ¹⁸	CPR ¹⁹	IR ²⁰
P280	FB	5	5	5	7	3	9	-	-	-	-	hom	hom	-	-	-	-	-	-
P281	FB	0	1	-	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P282	FB	40	25	40	51	29	43	-	-	-	-	hom	hom	-	-	-	-	-	-

*für Stanzen mit CPS<TPS wird der CPS-Wert auf TPS korrigiert, die Heterogenitätsdefinition (siehe Methoden) wird auf die korrigierten Daten angewendet

Bemerkung: P258-262 enthalten keine klinischen Daten und werden ausschließlich in der Abbildung 4 berücksichtigt, weswegen Sie in der Tabelle nicht aufgelistet sind.

¹ ID= Patienten-Identifikationsnummer

² Ko= Kollektiv (R= Rezidiv, R/08_13 und R/13_16= Fälle, die sowohl in Rezidiv- wie auch 08-13-bzw 13-16-Kollektiv enthalten sind, FB= prospektives Full Bio-Kollektiv).

³ TP1= TPS-Score 1. Wert

⁴ TP2= TPS-Score 2. Wert

⁵ TP3= TPS-Score 3. Wert

⁶ CP1= CPS-Score 1. Wert

⁷ CP2= CPS-Score 2. Wert

⁸ CP3= CPS-Score 3. Wert

⁹ I1= Immunscore 1. Wert

¹⁰ I2= Immunscore 2. Wert

¹¹ I3= Immunscore 3. Wert

¹² IS= Immunscore Mittelwert

¹³ TPh= TPS-Score-Heterogenität

¹⁴ CPh= CPS-Score-Heterogenität

¹⁵ TPP= TPS-Score Primärtumor

¹⁶ CPP= CPS-Score Primärtumor

¹⁷ IP= Immunscore Primärtumor

¹⁸ TPR= TPS-Score Rezidivtumor

¹⁹ CPR= CPS-Score Rezidivtumor

²⁰ IR= Immunscore Rezidivtumor

8 Literaturverzeichnis

- Ahmadzadeh, M. et al. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, 114:1537-1544.
- Alphametrix,(2005).alphametrix.de.
http://www.alphametrix.de/downloads/handbuch_mta1_vers1_view.pdf
- Amin, MB et al. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *A Cancer Journal for Clinicians*, ,67(2):93-99.
- Ang, KK et al. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 363, 24–35.
- Antonangeli, F. et al. (2020). Regulation of PD-L1 Expression by NF- κ B in Cancer. *Frontiers in Immunology*, 11:584626
- Badoual, C. et al. (2013). PD-1- expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Research*, 73:128– 38.
- Bai, X. et al. (2015). Characteristics of Tumor Infiltrating Lymphocyte and Circulating Lymphocyte Repertoires in Pancreatic Cancer by the Sequencing of T Cell Receptors. *Scientific Reports*, 5:13664
- Balermipas, P. et al. (2016). CD81 tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG). *International Journal of Cancer*, 138, 171–181.
- Balermipas, P. et al. (2017). The PD-1/PD-L1 axis and human papilloma virus in patients with head and neck cancer after adjuvant chemoradiotherapy: A multicentre study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *International Journal of Cancer*, 141, 594–603.
- Balermipas, P. et al.(2014). Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *British Journal of Cancer*, 110, 501–509.
- Banerjee, S. et al. (2017). JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects. *Drugs*, 77: 521-546.
- Banerjee, S. et al. (2017). Microbial signatures associated with oropharyngeal and oral squamous cell carcinomas. Microbial signatures associated with oropharyngeal and oral squamous cell carcinomas. *Scientific Reports*, 7,4036.

- Bernier, J. et al.(2004). Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 350, 1945–1952.
- Bhaijee, F. et al. (2016). PD-L1 expression as a predictive biomarker. *JAMA Oncology*, 54-5
- Blot, WJ et al. (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research* 48, 3282–3287.
- Braakhuis, BJM et al. (2002). Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head and Neck*, 24:198–206.
- Bradley, PJ et al. (2019). Hypopharyngeal Cancer. *Advances in Otorhinolaryngology*, Vol 83
- Bray, F. et al. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer Journal for Clinicians*, 68,, 394–424.
- Brizel, DM et al. (1997). Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 38, 285–289.
- Brockstein, B. et al. (2004). Patterns of failure, prognostic factors and survival in locoregionally advanced head and neck cancer treated with concomitant chemoradiotherapy: a 9-year, 337-patient, multi-institutional experience. *Annals of Oncology*, 1179-86.
- Burnette, BC et al. (2011). The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Research*, 71:2488–96.
- Burtneß, B. 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. *The Lancet* 394, 1915–1928.
- Büttner, R. et al. (2017). Programmed death-ligand1 immunohistochemistry testing:A review of analytical assays and clinical implementation in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 35:3867-3876.
- Callea, M. et al. (2015). Differential Expression of PD-L1 between Primary and Metastatic Sites in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunology Research*, 3(10):1158-64.
- Camus, M. et al.(2009). Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Research* 69, 2685-2693.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. (2015). *Nature*, 517: 576–82.

- Canene-Adams, C. (2013). Preparation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for immunohistochemistry. *Methods of Enzymology*, 533:225-33.
- Canning, M. et al. (2019) Heterogeneity of the head and neck squamous cell carcinoma immune landscape and its impact on immunotherapy. *Frontiers in Cell and Development Biology* 7, 52.
- Cerbelli, B. et al. (2022). Evaluating programmed death-ligand 1 (PD-L1) in head and neck squamous cell carcinoma: concordance between the 22C3 PharmDx assay and the SP263 assay on whole sections from a multicentre study. *Histopathology*, 80:397-406.
- Chemnitz, JM et al. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death I upon primary human T-cell stimulation, but only receptor ligation prevents T-cell activation. *Journal of Immunology*, 173(2):945-54.
- Chen, DS et al. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541:321–30.
- Chen, J. et al. (2012). Interferon- γ -induced PD-L1 surface expression on human oral squamous carcinoma via PKD2 signal pathway. *Immunobiology*, 217:385–93.
- Chen, J. et al. (2016). Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Annals of Oncology*, 27: 409- 416.
- Chen, SW et al. (2019). Expression of PD-1/PD-L1 in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance. *International Journal of Biological Markers*, 34:398-405.
- Chow, LQM et al. (2016). Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients with Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *Journal for Clinical Oncology*., 34(32):3838-3845
- Clark, TG et al. (2003). Survival Analysis Part I: Basic concepts and first analyses. *British Journal of Cancer* Volume 89, 232–238.
- Cohen, EEW et al. (2019). Pembrolizumab Versus Methotrexate, Docetaxel, or Cetuximab for Recurrent or Metastatic Head-and-Neck Squamous Cell Carcinoma (KEYNOTE-040): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Study. *The Lancet*, 393, 156–167.
- Cooper, JS et al (2004). Radiation Therapy Oncology Group 9501/Intergroup: Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*, 350, 1937-1944.
- Cox, D. (1972). Regression models and life tables (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society (Series B)*, 187–200.

- Dai, S. et al. (2014). The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cell Immunology*, 72–79.
- Darb-Esfahani, S. et al. (2016). Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget*, 7:1486–99.
- De Roest, RH et al. (2019). Molecular characterization of locally relapsed head and neck cancer after concomitant chemoradiotherapy. *Clinical Cancer Research*, 25: 7256–65.
- De Ruiter, EJ et al (2021). Comparison of three PD-L1 immunohistochemical assays in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Modern Pathology*, 1125-1132
- Demaria, S. et al. (2012). Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. *Frontiers in Oncology*, 2:95.
- Deng, L. et al. (2014). Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 124(2):687-95.
- Dietz, A. et al. (2018). Current Status of therapy and prophylaxis of oropharyngeal carcinoma. *Laryngorhinootologie*, 97(2):123-137.
- Downes, MR et al. (2020). Interobserver and Intraobserver agreement of PD-L1 scoring in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC), Urothelial Carcinoma (UC), and Breast Carcinoma (BC). *Histopathology*, 76(2): 191–200.
- Du, E et al. (2019). Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *Laryngoscope*, 129(11):2506-2513.
- Emancipator, K. et al. (2021). Comparing programmed death ligand 1 scores for predicting pembrolizumab efficacy in head and neck cancer. *Modern Pathology*, 34:532–541.
- Evrard, D. et al. (2020). PD-L1 expression in the microenvironment and the response to checkpoint inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology*.9(1):1844403.
- Fang, J et al. (2017). Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 17, 375.
- Ferlay, J. et al. (2020, September). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Retrieved from International Agency for Research on Cancer: <https://gco.iarc.fr/today>
- Ferlito, A. et al. (2002). Prognostic significance of microscopic and macroscopic extracapsular spread from metastatic tumor in the cervical lymph nodes. *Oral Oncology*, 747-751.
- Ferris, RL et al. (2016). Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*, 375, 1856–1867.

- Ferris, RL et al. (2018). Nivolumab vs. Investigator's Choice in Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: 2-Year Long-Term Survival Update of CheckMate 141 with Analyses by Tumor PD-L1 Expression. *Oral Oncol.*, 81, 45–51.
- Forastiere, AA et al.(2003). Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 349, 2091–2098.
- Fridman, WH et al. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, 12:298–306.
- Galluzzi, L. et al. (2019). WNT signaling in cancer immunosurveillance. *Trends Cell Biology*, 29: 44-65.
- Galon, J. et al. (2019). Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nature Reviews Drug Discovery* Volume 18, 197–218.
- Galon, J. et al. (2014). Towards the introduction of the immunoscore in the classification of malignant tumours. *Journal of Pathology* 232, 199-209.
- Gillison, ML et al. (2015). Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology.*;33(29):3235-42
- Glastonbury, CM et al. (2020). Critical Changes in the Staging of Head and Neck Cancer. *Radiology: Imaging Cancer* 2020, 190022.
- Gottgens, EL et al. (2019). HPV, hypoxia and radiation response in head and neck cancer. *British Journal of Radiology*. 92, 1093.
- Grandis, JR et al. (1998). Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *Journal of National Cancer Institute*, 90(11):824-32.
- Hafner, S. (2014). *Manual Kopf-Hals-Malignome*. Munich: Tumorzentrum München.
- Haque, S. et al. (2019). High-risk pathological features at the time of salvage surgery predict poor survival after definitive therapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, 88:9-15.
- Harb, J. et al. (2019). Recent development of WNT signaling pathway inhibitors for cancer therapeutics. *Current Oncology Reports*, 21: 12.
- Harris, J. et al. (2018). Association of survival with shorter time to radiation therapy after surgery for US patients with head and neck cancer. *JAMA Otolaryngology, Head and Neck Surgery*, 144(4):349-359.
- Hashmi, AA et al. (2020). p16 Immunohistochemical Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Association With Prognostic Parameters. *Cureus* 13, 12.

- Hecht, SS (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1194–1210.
- Hegde, JV et al. (2018). Head and neck cancer reirradiation with interstitial high-dose-rate brachytherapy. *Head and Neck* 40, 1524-1533.
- Hesselink, AT et al. (2005) Comparison of three different PCR methods for quantifying human papillomavirus type 16 DNA in cervical scrape specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4868–4871.
- Hirsch, FR et al. (2017). PD-L1 immunohistochemistry assays for lung cancer: Results from phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC assay comparison project. *Journal of Thoracic Oncology*, 12:208-222.
- Houten, VMM et al. (2002). Mutated p53 as molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *Journal of Pathology*, 198:476 – 86.
- Hong, AM et al. (2016). PD-L1 expression in tonsillar cancer is associated with human papillomavirus positivity and improved survival: implications for anti-PD1 clinical trials, *Oncotarget*, 7(47):77010-77020
- Huang, C. et al. (2021). Proteogenomic insights into the biology and treatment of HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cell*, 39:361–79.
- Itzhak, B. (2020). Late side effects of radiation treatment for head and neck cancer. *Radiation Oncology Journal* 38(2), 84-92.
- Jain, P. et al. (2008). Neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Indian Journal of Cancer*, 83-89.
- Jawhar, NMT. (2009). Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Annals of Saudi Medicine*., 123–127.
- Johnson, DE et al. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1):92
- Jung, AC et al. (2013). CD8-alpha T-cell infiltration in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma correlates with improved patient prognosis. *International Journal of Cancer*, 132:E26–36.
- Kather, JN et al. (2018). Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors. *eLife*, 7:e36967.
- Keck, MK et al. (2015). Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clinical Cancer Research*, 15;21(4):870-81.
- Keir, ME. et al. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual Review of Immunology*, 26:677–704.

- Kim, HS et al. (2016). Association Between PD-L1 and HPV Status and the Prognostic Value of PD-L1 in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research and Treatment*, 48(2):527-36
- Kim, RY et al. (2019). Increased Presence of Perineural Invasion in the Tongue and Floor of the Mouth: Could It Represent a More Aggressive Oral Squamous Cell Carcinoma, or Do Larger Aggressive Tumors Cause Perineural Invasion? *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 77:852–858.
- Kim, T. et al. (2019). P16 expression and its association with PD-L1 expression and FOXP3-positive tumor infiltrating lymphocytes in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular & Cellular Toxicology*, 15:137-143.
- Kobayashi, K. et al. (2018). Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 7(9):241.
- Kornepati, AVR et al. (2022). Programmed death ligand 1 signals in cancer cells. *Nature Reviews Cancer*.174-189.
- Krenacs, L et al. (2010). Heat-Induced Antigen Retrieval for Immunohistochemical Reactions in Routinely Processed Paraffin Sections. *Methods of Molecular Biology*, 588: 103–119.
- Latchman, Y. et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *National Immunology*, 261–68.
- Leeman, CR. (2020). Cancer of the Head and Neck. *Abeloff's Clinical Oncology*. 6th ed. Chapter 65
- Leeman, JE et al. (2017). Patterns of treatment failure and postrecurrence outcomes among patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma after chemoradiotherapy using modern radiation techniques. *JAMA Oncology*, 3:1487–94.
- Leemans, CR et al. (1994). Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer (Phila)*, 73:187–90.
- Lenouvel, D. et al. (2020). An update of knowledge on PD-L1 in head and neck cancers: Physiologic, prognostic and therapeutic perspectives. *Oral Diseases*, 26: 511-526.
- Lenouvel, D. et al. (2021). Clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 in oral cancer: A preliminary retrospective immunohistochemistry study. *Oral Diseases*, 27:173-182.
- Li, H. et al. (2019). The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression assessed by immunohistochemistry in lung cancer: a meta-analysis of 50 studies with 11,383 patients. *Translational Lung Cancer Research*, 8:429-449.

- Li, J. et al. (2021). Prognostic Value of Perineural Invasion in Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*, 11: 683825.
- Lind, M. et al. (2007). Real-time Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types. *Journal of Clinical Virology* 40, 321–324.
- Lohaus, F. et al. (2014). HPV16 DNA status is a strong prognosticator of loco-regional control after postoperative radiochemotherapy of locally advanced oropharyngeal carcinoma: results from a multicentre explorative study of the DKTK-ROG. *Radiotherapy Oncology*, 113:317–23.
- Lopes, G. et al. (2018). Pembrolizumab (pembro) versus platinum-based chemotherapy (chemo) as first-line therapy for advanced/metastatic NSCLC with a PD-L1 tumor proportion score (TPS) $\geq 1\%$: open-label, phase 3 KEYNOTE-042 study. *Journal of Clinical Oncology*.
- Lu, S. et al. (2019). Comparison of Biomarker Modalities for Predicting Response to PD1/PD-L1 Checkpoint Blockade: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncology*, 5(8):1195-1204.
- Magnes, T. et al. (2021). Prognostic and Predictive Factors in Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4981
- Maihöfer, C. et al. (2018). Postoperative (chemo) radiation in patients with squamous cell cancers of the head and neck –clinical results from the cohort of the clinical cooperation group “Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer”. *Radiation Oncology*, 13(1):123.
- Mandal, R. et al. (2016). The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight*, 1:e89829.
- Manson, QF et al. (2019). Frequent discordance in pd-1 and pd-11 expression between primary breast tumors and their matched distant metastases. *Clinical and Experimental Metastasis*, 36;29–37.
- Markman, M. (2021). cancercenter.com, <https://www.cancercenter.com/cancer-types/head-and-neck-cancer/symptoms>
- Martins, I. et al. (2018). Anticancer chemotherapy and radiotherapy trigger both non-cell-autonomous and cell-autonomous death. *Cell Death and Disease*, 9,(7):716.
- Marur, S. et al. (2017). E1308: Phase II Trial of Induction Chemotherapy Followed by Reduced-Dose Radiation and Weekly Cetuximab in Patients With HPV-Associated Resectable Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx- ECOG-ACRIN Cancer Research Group. *Journal of Clinical Oncology*, 35(5):490-497.

- Maruse, Y. et al. (2018). Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral Maxillofac Surgery*, 47:836-845.
- Marusyk, A. et al. (2020). Intratumor heterogeneity: the Rosetta stone of therapy resistance. *Cancer Cell*, 37(4): 471–484.
- Masterson, L. et al. (2014). De-escalation treatment protocols for human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of current clinical trials. *European Journal of Cancer*, 50; 2636–2648.
- McGranahan, N. et al. (2017). Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell*, 168:613–28.
- McLaughlin, J. et al. (2016). Quantitative assessment of the heterogeneity of PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer. *JAMA Oncology*, 2:46–54.
- Meng, X. et al. (2015). Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, 41: 868-876.
- Michaud, DS et al. (2014). High-risk HPV types and head and neck cancer. *International Journal of Cancer*, 135(7):1653-1661.
- Milanese-Yearsley, M et al. (2002). Tissue micro-array: a cost and timeeffective method for correlative studies by regional and national cancer study groups, *Modern Pathology*, 1366-1373
- Mirghani, H. et al. (2018). Treatment de-escalation for HPV-driven oropharyngeal cancer: where do we stand? *Clinical Translational Radiation Oncology*, 8; 4–11
- Mito, I. et al. (2021). Comprehensive analysis of immune cell enrichment in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, 16134.
- Moch, H. et al. (2001). Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Advances in Anatomic Pathology*, 8:14-20.
- Moody, CA et al. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*.(8):550-60
- Moratin, J. et al. (2019). Upregulation of PD-L1 and PD-L2 in neck node metastases of head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck.*, 2484-2491
- Moreno, AC. et al. (2019). Intensity modulated proton therapy (IMPT) - The future of IMRT for head and neck cancer. *Oral Oncology*, 88:66-74.
- Munari, E. et al. (2018). PD-L1 expression comparison between primary and relapsed non-small cell lung carcinoma using whole sections and clone SP263. *Oncotarget*. 13;9(54):30465-30471.

- Myers, JN et al. (2001). Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer*, 3030-3036.
- Narayanan, AM et al. (2020). Oral Cavity Cancer Outcomes in Remote, Betel Nut-Endemic Pacific Islands. *Annals of Otolaryngology, Rhinology, Laryngology*, 129(12):1215-1220.
- Näsman, A. et al. (2012). Tumor infiltrating CD81 and Foxp31 lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer. *PLoS One*, 7(6): e38711
- Nauta, IH et al. (2018). Evaluation of the eight TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands and the importance of additional HPV DNA testing. *Annals of Oncology*, 1273-1279.
- Ndiaye, C. et al. (2014). HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncology*, 15:1319–31.
- Nichols, AC et al. (2011). Surgical salvage of the oropharynx after failure of organ-sparing therapy. *Head and Neck*, 516-24.
- Nijkamp, M. et al. (2011). Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiotherapy and Oncology*, 99, 344–348.
- Nordfors, C. et al. (2013). CD81 and CD41 tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *European Journal of Cancer*, 49:2522–30.
- O'Donnell, JS et al. (2018). PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*, 48: 91-103.
- O'Sullivan, B. 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. *The Lancet*, P440-451.
- Okazaki, T. et al. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International Immunology*, 19:813–24.
- Oksuz, DC et al. (2011). Recurrence patterns of locally advanced head and neck squamous cell carcinoma after 3D conformal (chemo)-radiotherapy. *Radiation Oncology*, 6:54.
- Onishi, H. et al. (2016). Hedgehog signaling regulates PDL-1 expression in cancer cells to induce anti-tumor activity by activated lymphocytes. *Cell Immunology*, 310:199-204.
- Partlová, S. et al. (2015). Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 30, 4(1).

- Peltanova, B. et al. (2019). Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Molecular Cancer*, 18, 63.
- Peng, Q. et al. (2018). Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oral cancer. *Oncology letters*, 15,2 (2018): 1379-1388.
- Pierik, AS. et al. (2021). Resection Margins in Head and Neck Cancer Surgery: An Update of Residual Disease and Field Cancerization. *Cancers*, 13, 2635.
- Prichard, J. et al. (2015). Automated immunohistochemistry overview. In P. J. L. Fan L, *Handbook of practical immunohistochemistry: frequently asked questions*, 2nd edition. 2015.
- Puram, S. et al. (2017). Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell*, 171:1611–24.
- Puzanov, I. et al. (2017). Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 21;5(1):95.
- Pynnonen, M. et al. (2017). Clinical Practice Guideline: Evaluation of the Neck Mass in Adults. *Otolaryngology, Head and Neck Surgery*, 157, S1–S30.
- Ran, X. et al. (2017). Inhibitors of the pd-1/pd-l1 axis for the treatment of head and neck cancer: Current status and future perspectives. *Drugs, Design, Development and Therapy*, 11: 2007–2014.
- Rasmussen, JH et al. (2019). Intratumor heterogeneity of PD-L1 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 120:1003-1006.
- Rebelato, MC et al. (2016). Development of a programmed cell death ligand-1 immunohistochemical assay validated for analysis of non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma, *Diagnostic Pathology*, 11(1):95.
- Reck, M. et al. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375:1823-1833
- Rehman, JA et al. (2017). Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer. *Modern Pathology*, 30:340–349.
- Ribbat-Idel, J. et al. (2021). Immunologic "Cold" Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck Are Associated With an Unfavorable Prognosis. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, 8:622330.
- Rimm, DL et al. (2017). A prospective, multi-institutional, pathologist-based assessment of 4 immunohistochemistry assays for PD-L1 expression in non–small cell lung cancer. *JAMA Oncology*, 3:1051.

- Rischin, D. et al. (2010). Prognostic significance of p16INK4A and human papilloma- virus in patients with oropharyngeal cancer 82. treated on TROG 02.02 phase III trial. . Journal of Clinical Oncology, 28:4142–8.
- Ritprajak,P. et al. (2015). Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. Oral Oncology, 221-228.
- Röhrig, B.(2010).Die Wahl eines geeigneten Assoziationsmaßes hängt vom Skalenniveau und der Verteilung beider Größen ab. Während die parametrische Variante, der Korrelationskoeffizient nach Pearson, ausschließlich lineare Zusammenhänge zwischen stetigen Merkmalen prüf. Deutsches Ärzteblatt International 107, 343-8.
- Ruangritchankul, K. et al. (2019). Clinical evaluation of tumour-infiltrating lymphocytes as a prognostic factor in patients with human papillomavirus- associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. Histopathology, 75, 146–150.
- Saada-Bouزيد, E. et al (2017). Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. Annals of Oncology, 28,, 1605–1611 .
- Sakai, H. et al. (2019). Impact of cytotoxic chemotherapy on pd-l1 expression in patients with non-small cell lung cancer negative for egfr mutation and alk fusion. Lung Cancer, 127;59–65.
- Saleh, K. et al. (2019). Response to salvage chemotherapy after progression on immune checkpoint inhibitors in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. European Journal of Cancer 121, 123–129.
- Sampias,C.(2022).www.leicabiosystems.com.<https://www.leicabiosystems.com/de-de/knowledge-pathway/he-staining-overview-a-guide-to-best-practices>
- Sanchez-Canteli, M. et al. (2020). PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and better prognosis in patients with HPV-negative head and neck squamous cell carcin. Cancer Immunology, Immunotherapy, 69:2089-2100.
- Seiwert, TY et al. (2016). 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. Lancet Oncology, 17(7):956-965
- Scheel, AH et al. (2018).Interlaboratory concordance of PD-L1 immuno- histochemistry for non-small-cell lung cancer. Histopathology, 72:449–459.
- Schethenbach, K. et al. (2012). Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck in Fanconi Anemia: Risk, Prevention, Therapy, and the Need for Guidelines. Klinische Pädiatrie, 224(3):132–138.
- Schildhaus, HU. (2018). Der prädiktive Wert der PD-L1-Diagnostik. Der Pathologe 29, 498–519.

- Schmoll, HJ. (2006). Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie.
- Schulz, GB. et al. (2021). PD-L1 expression in bladder cancer: Which scoring algorithm in what tissue? *Urologic Oncology*, 2021, 39(10):734.e1-734.e10.
- Shin, MH et al. (2020). Current Insights into Combination Therapies with MAPK Inhibitors and Immune Checkpoint Blockade. *International Journal of Molecular Science*, 21(7): 2531.
- Skinner, HD et al. (2017). Integrative Analysis Identifies a Novel AXL-PI3 Kinase-PD-L1 Signaling Axis Associated with Radiation Resistance in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res.*,23(11):2713-2722
- Smeets, SJ. et al. (2007). A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *International Journal of Cancer*, 121, 2465–2472.
- Sobin, LH. et al. (2010). TNM seventh edition: What's new, what's changed. *Cancer*, 116:5336-9.
- Solomon, B. et al. (2018). Prognostic significance of PD-L1(+) and CD8(+) immune cells in HPV(+) oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Immunology Research*, 6;295–304.
- Squarize, CH et al. (2013). PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. *Neoplasia*, 15(5):461-71.
- Stein, AP et al. (2015). Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review. *Cancer Journal*, 138-46.
- Sterz, M. et al. (2010). A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral Oncology*, 116-122.
- Stovgaard, ES. et al. (2019). PD-L1-Expression in breast cancer: expression in subtypes and prognostic significance: a systematic review. *Breast Cancer Research and Treatment*, 174(3):571–84.
- Sun, XS et al. (2018). A phase II randomized trial of pembrolizumab versus cetuximab, concomitant with radiotherapy (RT) in locally advanced (LA) squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): First results of the GORTEC 2015-01 “PembroRad” trial. Meeting Abstract; 2018 ASCO Annual Meeting.
- Sutton DN et al. (2003). The prognostic implications of the surgical margin in oral squamous cell carcinoma, *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 32:30–4.
- Tabor, MP et al. (2004). Genetically Altered Fields as Origin of Locally Recurrent Head and Neck Cancer: A Retrospective Study. *Clinical Cancer Research*, Vol. 10, 3607–3613.

- Talamini, R. et al. (2002). Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control*, 13, 957–964.
- Tomaić, V. (2016). Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. *Cancers (Basel)*, 19;8(10):95
- Torlakovic, E. et al. (2020). “Interchangeability” of PD-L1 immunohistochemistry assays: a meta-analysis of diagnostic accuracy. *Modern Pathology*, 33:4–17.
- Udall, M. et al. (2018). PD-L1 diagnostic tests: A systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics. *Diagnostic Pathology*, 13:12,.
- Ugurel, S. et al. (2020). Translationale ADO-Registerstudie TRIM-ADJUVANT beim Melanom. *Forum*, 35:145
- Ventana.(2021).pim-eservices.roche.com
<https://pimeservices.roche.com/eLD/api/downloads/2456f3c8-2a9a-ea11-fc90-005056a71a5d?countryIsoCode=us>
- Ventana.(2014).ventana.com:[file:///Users/janrasim/Downloads/5424569001%20-%20ULTRA%20Cell%20Conditioning%20Solution%20\(ULTRA%20CC1\)%20\(1\).pdf](file:///Users/janrasim/Downloads/5424569001%20-%20ULTRA%20Cell%20Conditioning%20Solution%20(ULTRA%20CC1)%20(1).pdf)
- Vermorken, JB et al. (2008). Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, 359, 1116-1127.
- Vuky, J. et al. (2020). Long-Term Outcomes in KEYNOTE-052: Phase II Study Investigating First-Line Pembrolizumab in Cisplatin-Ineligible Patients with Locally Advanced or Metastatic Urothelial Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 38(23):2658-2666.
- Wang, C. et al. (2018). Reproducibility of pd-11 immunohistochemistry interpretation across various types of genitourinary and head/neck carcinomas, antibody clones, and tissue types. *Human Pathology*, 82;131–139.
- Wang, ZV et al. (2017). mTOR co-targeting strategies for head and neck cancer therapy. *Cancer Metastasis Reviews*,. 36, 491–502.
- Wansom, D. et al. (2012). Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16– associated oropharyngeal cancer. *Laryngoscope*, 122:121–7.
- Ward, MJ et al. (2014). Tumour-infiltrating lymphocytes predict for out- come in HPV-positive oropharyngeal cancer. *British Journal of Cancer*, 110:489–500.
- Waterman, C. et al. (2021). Recurrent HNSCC harbor an immunosuppressive tumor immune micro- environment suggesting successful tumor immune evasion. *Clinical Cancer Research*, 27:632–44.
- Weber, P. et al. (2022). Therapy-Related Transcriptional Subtypes in Matched Primary and Recurrent Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research*, 1038-1052.

- Weinstein, GS et al. (2012). Transoral robotic surgery: a multicenter study to assess feasibility, safety, and surgical margins. *Laryngoscope* 122, 1701–1707.
- Westra, WH. Et al. (2009). Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annual Review of Pathology*, 4, 49–70.
- WHO. (2020). GLOBOCAN: International Agency for Research on Cancer: All cancers fact sheet. Retrieved from GLOBOCAN: International Agency for Research on Cancer: All cancers fact sheet: GLOBOCAN: International Agency for Research on Cancer: All cancers fact sheet. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>
- Wienecke, K. (2019). Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. *Der Onkologe*, 25: 190-200.
- Wildsmith, S. et al. (2018). PD-L1 Expression in Patients Screened for Phase 2 Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Clinical Studies (HAWK and CONDOR). *Cancer Research*, 78 (Suppl. 13), 5530.
- Wing, P. et al. (2002). Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma-A comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, martinez-gimeno score and pathologic features. *Head and Neck*, 24:513-20.
- Wintergerst, L. et al. (2018). A prognostic mRNA expression signature of four 16q24.3 genes in radio(chemo)therapy-treated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) *Molecular Oncology*, 2085-2101.
- Wittekind, C. (2006). Krebsgesellschaft.de. <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/basis-informationen-krebs-allgemeine-informationen/klassifikation-von-tumoren-tnm-.html>
- Woolgar, JA (2006). Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 42:229-39.
- Woolgar, JA et al. (2003). Cervical lymph node metastasis in oral cancer: the importance of even microscopic extracapsular spread. *Oral Oncology*, 39:130-7.
- Wusiman, D. et al. (2022). The clinicopathological significance of PD-L1 expression assessed by the combined positive score (CPS) in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathology - Research and Practice*, S0344-0338(22)00178-9.
- Xu, W. et al. (2020). Intratumoural immunotherapies in oncology. *European Journal of Cancer*, Volume 27, 1-11.
- Yamashita, S. (2017). Heat-Induced Antigen Retrieval in Immunohistochemistry: Mechanisms and Applications. *Methods Molecular Biology*, 1560, 147-161.
- Yearley, JH. et al. (2017). PD-L2 expression in human tumors: relevance to anti-PD-1 therapy in cancer. *Clinical Cancer Research*, 23:3158–67.

Yu, GT et al. (2015). PD-1 blockade attenuates immunosuppressive myeloid cells due to inhibition of CD47/SIRP α axis in HPV negative head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 6(39):42067–80.

Zander, H. et al.(2020). Checkpoint Inhibitoren in der Tumorthherapie, *Bundesgesundheitsblatt* 63:1322-1330

Zwiener, I. et al. (2011). Survival Analysis—Part 15 of a Series on Evaluation of Scientific Publications. *Deutsches Ärzteblatt International* 108, 163-9.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an nachstehende Personen zum Ausdruck bringen, ohne deren Unterstützung die Anfertigung der vorliegenden Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Horst Zitzelsberger für seine fachlich wie menschlich wunderbare Unterstützung und Betreuung danken. Durch seine stets kompetenten Vorschläge und die konstruktive Kritik, hat er mir einige Hürden im Laufe der Promotion genommen und einen zentralen Anteil an der vorliegenden Arbeit. Vor allem die stets sehr produktiven Besprechungen und Zoom-Meetings mit Daniel Samaga und Ihm waren ein wesentlicher Bestandteil zum Gelingen der vorliegenden Arbeit. Daniel Samaga hat mich im Laufe der Promotion wiederholt für statistische Fragestellungen und Fehlerquellen sensibilisiert und es trotz der Corona-bedingten Distanz stets geschafft, mir auch anspruchsvollere statistische Methoden auf eine sehr verständliche und geduldige Art zu vermitteln.

Weiterhin danke ich den beiden weiteren Mitgliedern meines Betreuungskomitees: Frau Prof. Dr. Kirsten Lauber und Herrn Prof. Dr. Christoph Walz. Sie waren stets zur Stelle bei verschiedensten Fragestellungen, sei dies bei histopathologisch-technischen oder immunologischen Aspekten meiner Promotion.

Auch Julia Heß-Rieger von der Abteilung für Strahlenzytogenetik des Helmholtz Zentrum München gilt mein Dank. Sie hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen und konnte mir vor allem bei der „Entschlüsselung“ der verschiedenen Patientenkollektive immer wieder zuverlässig helfen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen wunderbaren Eltern und meinen beiden Schwestern für Ihre stetige Unterstützung in meinem Leben. Weiterhin hat auch meine Lebensgefährtin durch ihre konstruktive und motivierende Art einen wichtigen Anteil an der vorliegenden Arbeit.

Alle oben genannten Personen haben mich immer wieder auf unterschiedliche Arten in meinem Promotionsvorhaben bestärkt und dafür danke ich Ihnen von ganzem Herzen.

