Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. T. Hoffmann

Titel der Dissertation:

Retrospektive Studie zur Untersuchung des Einflusses von Radiochemotherapie auf Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs mit Fokus auf Therapieversagern

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
In der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Peter Minkenberg
Heinsberg 2020

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Patrick Schuler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Frank Wilde

Tag der Promotion: 02.06.2022

Gewidmet

Meinen Eltern

Teile dieser Dissertation sind erschienen in Doescher J, Minkenberg P, Laban S, Kostezka U, von Witzleben A, Hoffmann TK, Schuler PJ, Weissinger SE. Immune checkpoint expression in HNSCC patients before and after definitive chemoradiotherapy. Head Neck. 2021 Mar;43(3):778-787. doi: 10.1002/hed.26534. Epub 2020 Nov 6. PMID: 33159481.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 PLATTENEPITHELKARZINOM DES KOPF-HALS-BEREICHES 1

1.2 EPIDEMIOLOGIE UND LOKALISATION 1

1.2.1 HYPOPHARYNX 2

1.2.2 OROPHARYNX 2

1.2.3 MUNDHÖHLE 3

1.2.4 LARYNX 3

1.3 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE INKL. ROLLE DES IMMUNSYSTEMS BEI DER KARZINOGENESE 4

1.4 DIAGNOSTIK INKL. KLASSIFIKATION (TNM-SYSTEM) 6

1.5 THERAPIE UND PROGNOSE 8

1.6 IMMUNCHECKPOINT GRUNDLAGEN 15

1.7 NEUE THERAPIEANSÄTZE 17

1.7.1 PD-1/PD-L1 18

1.7.2 CD27 20

1.8 ZIELSETZUNG 23

2 MATERIAL UND METHODEN 24

2.1 PATIENTEN 24

2.1.1 EINSCHLUSSKRITERIEN 24

2.1.2 AUSSCHLUSSKRITERIEN 24

2.1.3 MATERIAL 24

2.2 SCHNITTANFERTIGUNG 24

2.2.1 SCHNEIDEN 24

2.2.2 VORBEHANDLUNG DER SCHNITTE 25

2.2.3 ETABLIERUNG DER FÄRBUNG 26

2.2.4 FÄRBUNG DER SCHNITTE 26

2.3 IMMUNHISTOCHEMIE 27

2.4 MATERIAL 28

2.4.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN 28

2.4.2 ELEKTRONISCHE DATENVERARBEITUNG 29

2.5 METHODEN 29

2.5.1 ETHIKANTRAG 29

2.5.2 Statistische Auswertung 29
2.5.3 Auswertung der Schnitte 30

3 ERGEBNISSE 40

3.1 Charakterisierung der Patientenkohorte 40
3.2 Expressionsstatus 42
3.2.1 PD-L1 Expressionsstatus Zellen des Tumorstromas 42
3.2.2 PD-L1 Expressionsstatus auf Tumorzellen 42
3.2.3 PD-1 Expressionsstatus auf Zellen des Tumorstromas 43
3.2.4 PD-1 Expressionsstatus auf Tumorzellen 43
3.2.5 CD27 Expressionsstatus auf Immunzellen im Stroma 43
3.2.6 Betrachtung des Expressionsstatus vor und nach RCT stratifiziert nach Ansprechen 44
3.3 Expressionsveränderungen durch Art des Chemotherapeu-tikums 45
3.4 Expressionsstatus und Gesamtüberleben 46
3.5 Expressionsstatus und Rezidiv-Rate 50
3.6 Expressionsstatus und krankheitsfreies Überleben 52
3.7 Korrelation der PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas und Tumorzellen vor RCT 59
3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse 59

4 DISKUSSION 61

4.1 Methodenkritik 61
4.2 Diskussion der Ergebnisse 62
4.3 Ausblick 70

5 ZUSAMMENFASSUNG 73

6 LITERARTURVERZEICHNIS 75

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 92

8 TABELLENVERZEICHNIS 95

9 LEBENSLAUF 96

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
Anti-PD-1	Anti-Programmed Death-1
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APM	Antigen-Verarbeitungs-Maschinerie
CCRT	Concurrent chemoradiation therapy/gleichzeitige Radiochemotherapie
CD4	cluster of differentiation 4
CD27	cluster of differentiation 27
CR	complete response/vollständige Antwort
CT	Computertomographie
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor/epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FLU	Influenza-M1-Peptid
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
GITR	glucocorticoid-induced TNFR-related protein
Gy	Gray
HLA	humanen Leukozyten-Antigens
HNSCC	Head and neck squamous-cell carcinoma/Kopf-Hals Plattenepithelkarzinom
HPV	Humanen Papillomavirus
IFN-γ	Interferon-γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMRT	RT-Intensitätsmodulation
ITN	Intubationsnarkose

JAK2	Januskinase 2
KHT	Kopf- und Halskarzinom
moAbs	monoklonale Antikörper
MRT	Magnetresonanztomographie
NA	Not applicable/ nicht auswertbar
NCCN	National Cancer Comprehensive Network
NF-κB	Nuclear Factor κ-Light Chain Enhancer
NK	natürlichen Killerzellen
NT	No Tumor/ kein Tumor
PBS	Phosphate buffered Saline/ Phoshat-gepufferte Salzsäure
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RCT	Radiochemotherapie
ROS	reaktiver Sauerstoffspezies
PR	partial response/ teilansprechen
RT	Strahlentherapie
SBRT	stereotaktischen Körperstrahlentherapie
SRS	stereotaktischen Radiochirurgie
STAT	Signaltransducer und Aktivator der Transkription
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β
T-Zellen	Thymus-Zellen
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TKIs	Tyrosine kinase inhibitors
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNFRSF7	tumor necrosis factor receptor superfamily 7
TNM	Tumor-Nodus-Metastase
TRAF	TNFR-associated factor proteins
Tregs	regulatorische T-Zellen
TSA	tumorspezifische Antigene
UICC	Union International Contre le Cancer

VEGF	Vascular Endothelial Growth Fact

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches

Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs entstehen an mehreren anatomischen Lokalisationen. Es werden klassischerweise Karzinome der Mundhöhle, des Nasopharynx, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx unterschieden (Marur & Forastiere, 2008).

Eine anhaltende Exposition gegenüber Tabak, tabakähnlichen Produkten, wie Betelnüssen, und Alkohol erhöhen das Risiko für die Entwicklung solcher Karzinome (Marur & Forastiere, 2008).

Die Behandlung von Kopf- und Halskarzinomen (KHT) erfolgt durch drei wesentliche Behandlungsmodalitäten. Hierzu gehören die chirurgische Therapie, die Bestrahlung und die Chemotherapie. Die Wahl der Behandlungsoption richtet sich nach dem TNM-Stadium und der körperlichen Verfassung des Patienten (Marur & Forastiere, 2008).

1.2 Epidemiologie und Lokalisation

Jährlich werden weltweit über 500.000 neue Fälle von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs (HNSCC) gemeldet (Torre et al., 2015).

Im Jahr 2016 erkrankten laut Angaben des Robert Koch Instituts rund 13.900 Menschen in Deutschland an einer bösartigen Neubildung im Kopf-Hals-Bereich. Im gleichen Zeitraum verstarben ca. 5.457 Patienten an der Erkrankung. Von den Neuerkrankungen waren 4.180 Frauen und 9.720 Männer betroffen. Hier ist eine steigende Tendenz für die kommenden Jahre bei Frauen und ein leichter Rückgang bei Männern zu erwarten. Schwankungen in der Inzidenz werden auf das unterschiedliche Rauch- und Trinkverhalten in der Gesellschaft zurückgeführt. Um die Anzahl der Neuerkrankungen zu mindern, scheint eine Aufklärung über die Risikofaktoren als primäre Prävention sinnvoll zu sein (Lang et al., 2002).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern und Frauen in der sechsten bis siebten Lebensdekade (Kaatsch & Spix, 2019).

In den letzten zehn Jahren traten oropharyngeale Plattenepithelkarzinome deutlich häufiger auf als Karzinome des Larynx und des Hypopharynx. Diese Veränderung

ist auf einen Rückgang des Zigarettenkonsums und eine gleichzeitig erhöhte Exposition gegenüber des onkogenen Humanen Papillomavirus (HPV) zurückzuführen (Sturgis & Cinciripini, 2007, Gillison et al., 2012).
Die onkogenen Virus-Typen HPV-16, HPV-18, HPV-31 und HPV-33 werden sexuell übertragen und gelten als Hochrisikofaktoren für eine maligne Transformation infizierter Zellen (Marur et al., 2010).
Die Inzidenz von HPV positiven, oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen ist in den USA zwischen 1988 und 2004 um 225 % gestiegen; die der HPV negativen um 50 % gesunken (Chaturvedi et al., 2011).
Darüber hinaus gibt es weitere Risikofaktoren, wie zum Beispiel eine genetische Prädisposition, schlechte Mundhygiene, rezidivierende Infektionen, Mangelernährung und eine berufliche Exposition gegenüber kanzerogenen Stoffen (Boots et al., 2000).

1.2.1 Hypopharynx

Der Hypopharynx erstreckt sich vom oberen Rand des Zungenbeins bis zum unteren Rand des Ringknorpels. Er wird in folgende vier Bezirke unterteilt:

1. Postcricoidale Region
2. Sinus piriformis
3. Hypopharyngealer Anteil der aryepiglottischen Falte
4. Posteriore Wand des Hypopharynx
   (Wittekind, 2017)

Jährlich werden etwa 14.400 neue Fälle pharyngealer Plattenepithelkarzinome diagnostiziert. Dabei sind 3.400 dieser Fälle hypopharyngealen Ursprungs (Edge & Compton, 2010). Das Hypopharynxkarzinom macht etwa 3 – 4 % aller Kopf-Hals-Karzinome aus (Hall et al., 2008).

1.2.2 Oropharynx

Anatomisch besteht der Oropharynx aus dem weichen Gaumen, der Basis und dem hinteren Drittel der Zunge, den Gaumenmandeln, den Gaumenbögen, den Valleculae und der Rachenhinterwand (Wittekind, 2017).
Die Tatsache, dass Teile des Oropharynx mit hochspezialisiertem lymphatischen Gewebe ausgekleidet sind, wie beispielsweise die Tonsillenkrypten, erklärt die

erhöhte Anfälligkeit des Oropharynx für HPV-verursachte Tumoren (Lyford-Pike et al., 2013).

Karzinome viraler Genese weisen biologische Unterschiede zu Tabak verursachten Karzinomen auf und haben zudem eine bessere Prognose. Die therapeutischen Strategien zwischen den beiden Subtypen der Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes, die mit verschiedenen Risikofaktoren verbunden sind, sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch noch identisch. Aufgrund der relativ guten Prognose HPV positiver oroharyngealer Karzinome ist es zukünftig das Ziel, die Behandlung zu deintensivieren, um Folgeschäden zu minimieren und die Lebensqualität zu verbessern (Philouze et al. 2018).

1.2.3 Mundhöhle

Anatomisch besteht die Mundhöhle aus der Lippen- und Wangenschleimhaut, dem Mundboden, dem Alveolarkamm mit Gingiva, den vorderen Zweidritteln der Zunge, dem harten Gaumen und dem retromolaren Trigonum (Wittekind, 2017).

Über 90 % der Mundhöhlenkarzinome sind Plattenepithelkarzinome, die aus der Mundschleimhaut hervorgehen. Malignome der Mundhöhle werden häufig erst spät erkannt, sodass die Überlebensrate in den letzten drei Jahrzehnten nicht wesentlich gesteigert werden konnte (Neville & Day, 2002).

Die meisten Mundhöhlenkarzinome (ca. 80 %) treten im Bereich des Unterkiefers auf. Dabei sind vor allem die vorderen, lateralen Zweidrittel der Zunge und der vordere Mundboden betroffen (Kruchten, 2011).

1.2.4 Larynx

Das Larynxkarzinom ist der häufigste Tumor des Kopf- und Halsbereichs (KHT). Die Inzidenz ist in den letzten Jahren bei Männern gesunken, während sie bei Frauen kontinuierlich steigt. Die Inzidenz in Deutschland liegt bei 5-7/100.000 Männer/Jahr und 0,6-0,8/100.000 Frauen/Jahr. Aufgrund der erhöhten Lebenserwartung steigt das Durchschnittsalter von Patienten mit einem Larynxkarzinom. Tabak und Alkohol sind immer noch die primären Risikofaktoren, die bei mindestens 80 % der Patienten für die Krankheit verantwortlich sind. Trotz neuer diagnostischer Werkzeuge wird bei über der Hälfte der Patienten der Tumor im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Sethi & et al., 2009). Die Überlebensraten haben sich in den

letzten zehn Jahren in Deutschland nicht signifikant verbessert und die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate beträgt etwa 60 %. Ein Rückgang der Überlebensrate, wie er in den USA beobachtet wird, konnte für Deutschland jedoch nicht bestätigt werden (Pantel & Guntinas-Lichius, 2012).
Die Lebensqualität ist ein relevantes Kriterium für den Therapieerfolg bei Patienten mit einem Larynxkarzinom (Ohlwein et al., 2005).
Larynxkarzinome können abhängig von ihrer Lage zu den Stimmlippen in drei Gruppen eingeteilt werden (Peller et al., 2016):

1. supraglottische Karzinome
2. glottische Karzinome
3. subglottische Karzinome

1.3 Ätiologie und Pathogenese inkl. Rolle des Immunsystems bei der Karzinogenese

Das Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom entsteht durch Entartung der Keratinozyten und wird wie jedes Karzinom durch DNA-Mutationen verursacht, die häufig spontan auftreten. Diese treten jedoch durch Exposition gegenüber chemischen, physikalischen oder mikrobiellen Mutagenen verstärkt auf. Die verschiedenen Veränderungen in der DNA können von einem normalen Keratinozyten zu einem prämalignen oder potenziell malignen Keratinozyten übergehen, der durch die Fähigkeit gekennzeichnet ist, sich weniger kontrolliert zu vermehren. Die Zellen werden autonom und es entsteht ein echtes Karzinom, das durch die Invasion der Epithel-Basalmembran und letztendlich durch Metastasen in Lymphknoten, Knochen, Gehirn, Leber und anderen Organen gekennzeichnet ist (Scully & Bagan, 2009).
Die wichtigsten Mutagene für die Karzinogenese von HNSCC, die meistens bei älteren Männern auftreten, sind vor allem Tabak und Alkohol, in einigen Fällen sind jedoch Betelnüsse, Strahlenexposition, Infektionen oder Immunsuppression relevant (Cogliano et al., 2004).
Viele Faktoren spielen im Zusammenhang mit dem Lebensstil eine Rolle. Auch Umwelteinflüsse und Genetik können beteiligt sein. Weltweit sind 25 % der Fälle von HNSCC auf Tabakkonsum (Rauchen und/oder Kauen), 7 – 19 % auf Alkoholkonsum und 10 – 15 % auf Mangel an Mikronährstoffen zurückzuführen (Scully & Bagan, 2009).

Molekulare Veränderungen

Karzinome entstehen in mehreren Schritten, von denen jeder durch die sequentielle Stimulierung zusätzlicher genetischer Defekte und anschließende klonale Expansion gekennzeichnet ist. Die bei KHT beobachteten genetischen Veränderungen sind hauptsächlich auf die Onkogenaktivierung und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zurückzuführen, was zu einer Deregulierung der Zellproliferation und zum Tod führt. Diese genetischen Veränderungen umfassen die Genamplifikation und Überexpression von Onkogenen wie MYC, ERBB-2, epidermalem Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), CCND-1 und Mutationen, Deletionen und Hypermethylierungen, die zur Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p16 und p53 führen (Mehrotra & Yadav, 2009).

Immun-escape Mechanismen bei KHT

HNSCC-Zellen entwickeln während der Karzinogenese die Fähigkeit, der Immunüberwachung und der anschließenden Eliminierung zu entkommen (Immun-escape). Die Tumorzellen interagieren indirekt mit dem Immunsystem, um eine immunsuppressive Mikroumgebung aufrechtzuerhalten. Die Sekretion von Zytokinen wie TGF-β, Interleukin 10 oder Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) schafft eine tumorfördernde, immunsuppressive Umgebung (Muenst et al., 2016).

Zusätzliche Faktoren, wie die Sekretion von Interleukin 6, welche die Aktivierung von T-Zellen (Thymus-Zellen), NK-Zellen oder die Reifung dendritischer Zellen über STAT3 verhindern, modulieren das zelluläre Immunsystem weiter und führen zu einem immunsuppressiven Milieu (Muenst et al., 2016).

Andererseits ist eine Schlüsselkomponente für den Immun-escape von HNSCC-Zellen die Verringerung ihrer inhärenten Immunogenität durch Herunterregulieren (aber nicht vollständigen Verlust) von Molekülen des humanen Leukozyten-Antigens (HLA) der Klasse I und Verlust der Antigen-Verarbeitungs-Maschinerie (APM) (Lalami & Awada, 2016).

Ein weiterer Mechanismus, der zu einer Hemmung des Immunsystems führt, läuft über die Expression von blockierenden Immun-Checkpoint-Liganden auf der Tumorzelloberfläche (Schoppy & Sunwoo, 2015).

T-Zellen spielen sowohl bei der natürlichen als auch bei der therapeutisch

induzierten Immunbearbeitung eine entscheidende Rolle (Schreiber, et al., 2011). Zu diesen Zellen gehören regulatorische T-Zellen (Tregs), die CD4, CD25 und den Transkriptionsfaktor Foxp3 co-exprimieren sowie Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen, die CD4 oder CD8 exprimieren (Schreiber et al., 2011). Eine wirksame Krebsimmunüberwachung erfordert die Expression von tumorspezifischen Antigenen (TSAs), die ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert und von mutierten Genen kodiert werden sowie von Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs), die von normalen und Tumorzellen gemeinsam genutzt werden und die T-Zell-Expansion stimulieren können (Mapara & Sykes, 2004 Schreiber et al., 2011 (Schumacher & Schreiber, 2015).

Bei TSAs ermöglichen die Sensitivität und Spezifität der T-Zell-Erkennung von CD8 positiver T-Zellen, tumorspezifische Peptide mit einzelnen Aminosäureveränderungen zu unterscheiden (Savage, Leventhal, & Malchow, 2014)

TSAs variieren jedoch für jeden Tumor und ihre Identifizierung erfordert eine umfassende Sequenzierung für tumorspezifische Mutationen und Identifizierung immunogener Epitope (Manzo, Heslop, & Rooney, 2015).

1.4 Diagnostik inkl. Klassifikation (TNM-System)

Diagnostik

Alle Patienten mit Schleimhautläsionen unbekannten Ursprungs, die über einen Zeitraum von mehr als 2 Wochen persistieren, sollten unverzüglich an einen Spezialisten überwiesen werden (Wolff et al., 2012).

Dieser untersucht als erstes die klinischen Aspekte, zum Beispiel durch Abtasten oder visuell durch eine Laryngoskopie.

Anhand von bildgebenden Diagnostiken kann ein Anfangsverdacht näher untersucht werden.

Dabei kommen vor allem Ultraschallgeräte (Sonographie), Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET), aber auch klassisches Röntgen zur Untersuchung des Brustkorbs und der Speiseröhre bei Kontrastmittelgabe zum Einsatz.

Auf eine bildgebende Diagnostik folgt eine Biopsie-Entnahme, häufig in Kombination mit einer Panendoskopie in Intubationsnarkose (ITN).

Mit den gesammelten Informationen wird nun ein Tumor-Staging vorgenommen, um

den Tumor anhand des TNM-Systems beurteilen zu können und weitere Therapieschritte zu planen (Schrank, 2013).

Das TNM-System ist das weltweit häufigste verwendete Hilfsmittel zur Klassifizierung solider Tumore anhand von Tumorgröße sowie -ausdehnung, des Befalls lokaler Lymphknoten und des Vorliegens von Fernmetastasen. Die Einteilung hat prognostische Implikationen und ist Grundlage bei der Therapieauswahl. Aufgrund der Kenntnis über neue prognostisch relevante Parameter, wie dem Vorliegen einer Infektion mit onkogenen Subtypen des humanen Papillomavirus (HPV) (Amin et al., 2017), wurde seit dem 01.01.2017 die Klassifikation in Form der 8. Ausgabe vor allem für den HNO-Bereich grundlegend überarbeitet.
Das „T“ in TNM gibt Auskunft über die Ausbreitung des primären Tumors, das „N“ sagt aus, ob regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden sind bzw. fehlen und wie weit sie sich ausgebreitet haben. Das „M“, der letzte Bestandteil der TNM-Klassifikation, betrachtet das Vorhandensein oder Fehlen von Fremdmetastasen. Das System ist exemplarisch in den Tabellen 1-3 dargestellt.

Tabelle 1: Beurteilung des Primärtumors, TNM-Klassifikation nach Wittekind (Wittekind, 2017)

T-Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden.
T0	Kein Anhalt auf Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1-4	Steigend mit zunehmender Größe und Invasionstiefe des Primärtumors

Tabelle 2: Beurteilung der Lymphknoten, TNM-Klassifikation nach Wittekind (Wittekind, 2017)

N-regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden.
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1-3	Abhängig von der Größe des Lymphknotens, Anzahl der betroffenen Lymphknoten, ipsilaterale oder kontralateralen Seite betroffen und ob eine extranodale Ausbreitung vorhanden ist sowie einem positiven oder negativen HPV-Status.

Tabelle 3: Beurteilung der Fernmetastasen, TNM-Klassifikation nach Wittekind (Wittekind, 2017)

M-Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastase(n)
M1	Fernmetastase(n)

1.5 Therapie und Prognose

Therapie

Die Anwendung von Operation, Bestrahlung und/oder Chemotherapie hängt von der Zugänglichkeit und Lokalisation des Tumors ab, sowie davon, ob ein Ansatz zur Erhaltung der Organe möglich ist. Die Hauptbehandlungsoption bei primären und sekundären malignen Erkrankungen sowie bei wiederkehrenden Erkrankungen ist die chirurgische Therapie (Galbiatti et al., 2013).

Im Allgemeinen gibt es drei Hauptansätze für die Erstbehandlung lokal fortgeschrittener Kopf-Hals-Karzinome:

1. Primäre platinbasierte Radiochemotherapie, die Operation wird einer eventuellen Resterkrankung vorbehalten;

2. Operation mit Neck Dissection und Rekonstruktion, gefolgt von adjuvanter Bestrahlung +/- Chemotherapie, je nach Vorhandensein von nachteiligen Risikofaktoren;

3. Induktionschemotherapie, gefolgt von definitiver Radiochemotherapie und/oder

Operation. Derzeit gibt es keine evidenz-basierten Daten, die darauf hindeuten, die Induktionstherapie außerhalb von klinischen Studien einer primären Radiochemotherapie (RCT) vorzuziehen (Pignon et al., 2009).
Ungefähr 60 % der Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC befinden sich in einem Stadium, für das eine multimodale Therapie mit kurativer Intention empfohlen wird (Galbiatti et al., 2013).

Chirurgie

Die Anwendung der transoralen, teils auch laserunterstützten Chirurgie mit anschließender Strahlentherapie ist eine gängige Praxis bei der Behandlung von oropharyngealen, hypopharyngealen und supraglottischen Karzinomen im Frühstadium (Karatzanis et al., 2010).
Frühe Glottiskarzinome zeigen nach Behandlung mit einer einzelnen Modalität ausgezeichnete onkologische Ergebnisse. Die transorale Laserchirurgie ist hier die Behandlung der Wahl, die Strahlentherapie eine gute Alternative mit vergleichbarem Outcome (Karatzanis et al., 2010).
Obwohl das Erreichen tumorfreier Operationsränder das primäre Ziel der Kopf-Hals-Chirurgie ist, kann dies in einigen Fällen aufgrund der Infiltration vitaler Strukturen wie z. B. der Halsschlagader oder die prävertebrale Faszie, nicht verwirklicht werden. In diesem Fall stellt die Infiltration vitaler Strukturen eine Kontraindikation für eine OP dar.
Ein tumorinfiltrierter Absetzungsrand ist mit einer verringerten Überlebensrate verbunden. Daher sollte ein Patient erneut operiert werden, wenn der Tumor nicht vollständig entfernt wurde (Sessions et al., 2000).
Das Erreichen tumorfreier Resektionsränder kann jedoch in vielen Fällen zur Beeinträchtigung wichtiger Funktionen wie Kauen, Schlucken sowie Sprechen führen und die Lebensqualität mindern (Haque et al., 2006). Deshalb ist die primäre Radiochemotherapie eine Alternative für Patienten mit fortgeschrittenem KHT.

Strahlentherapie

Bei der Strahlentherapie werden energiereiche elektromagnetische Wellen (Röntgen- oder γ-Strahlen), geladene Teilchen (Elektronen, Protonen oder Alpha-Teilchen) oder andere Methoden zur Behandlung von bösartigen und gutartigen Krankheiten eingesetzt (Held, 2006). Die Absorption ionisierender Strahlung,

gemessen in Gray (Gy), durch biologisches Gewebe führt entweder direkt oder indirekt über die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu Strangbrüchen von Desoxyribonukleinsäure (DNA), die zum Zelltod durch Autophagie, Nekrose oder Apoptose führen. Um die Toxizität des normalen Gewebes zu minimieren, wird die Gesamtbestrahlungsdosis, die erforderlich ist, um die Tumorabtötung zu erreichen, häufig in kleinere Dosen „fraktioniert“, die typischerweise täglich appliziert werden (Held, 2006). Je nach Tumorart, Lokalisation oder Vorliegen einer schweren Erkrankung können Dosen von 50 – 70 Gy in Einzeldosen von 1,5–2,25 Gy pro Fraktion bei Krebserkrankungen des Kopfes und des Halses verabreicht werden.

Die technologischen Fortschritte bei der transkutanen Strahlentherapie, einschließlich der CT-basierten inversen Planung, der Mehrblattkollimation, der Patientenimmobilisierung und der aktiven Bildführung, haben zur Entwicklung von Techniken wie der stereotaktischen Körperstrahlentherapie (SBRT) und der stereotaktischen Radiochirurgie (SRS) geführt, die präzise Abgaben sehr hoher Strahlungsdosen in 1 bis 5 Fraktionen ermöglichen. Diese Techniken werden derzeit zur Behandlung von Hirn- und Knochenmetastasen, nicht kleinzelligem Lungenkrebs im Frühstadium, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Prostatakrebs und wiederkehrenden Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt (Baliga et al., 2017, Herman et al., 2015, Meier et al., 2016, Timmerman et al., 2010). Während diese hohen Strahlendosen zu irreversiblen, tödlichen DNA-Schäden führen, deuten sowohl präklinische als auch klinische Daten darauf hin, dass Änderungen des TME auch zur Tumorkontrolle beitragen können (Arnold et al., 2018, Manukian et al, 2019).

In Bezug auf die Strahlentherapie (RT) hat sich gezeigt, dass eine RT-Intensitätsmodulation (IMRT) im Vergleich zu herkömmlichen Techniken zunehmend vorteilhaft ist, z.B. konventionelle RT (2D) und Conformation (3D), indem es eine homogenere Dosisabdeckung zum Zielvolumen und eine Verringerung der Dosis im umgebenden Gewebe ermöglicht. Die höchste Dosis steht im Zusammenhang mit einer besseren Tumorkontrolle und besseren Überlebensraten (Duprez et al., 2009).
Bei Patienten mit HNSCC wird meist eine hyperfraktionierte Bestrahlung eingesetzt. Diese Behandlung führt zu unterschiedlich intensiven Reaktionen in der

Schleimhaut. Eine dieser Reaktionen ist die orale Mukositis. Diese verursacht erhebliche Schmerzen, Kau- und Schluckbeschwerden und gilt als schwächste akute Reaktion bei der Behandlung von KHT (Santos et al., 2011).
Bei der Anwendung der Brachytherapie bei Patienten mit HNSCC steht die Strahlenquelle in direktem Kontakt mit dem zu bestrahlenden Gewebe. Dies erhöht das Risiko der Entwicklung einer Weichteilnekrose, die als Geschwür definiert werden kann, das sich im bestrahlten Gewebe befindet, ohne das Vorhandensein von Restmalignität (Jham & Freire, 2006, Galbiatti et al., 2013).

Radiochemotherapie/ Kombinationstherapie

Die gleichzeitige Radiochemotherapie gehört mittlerweile zur Standartbehandlung von Kopf-Hals-Karzinomen und verbessert die Gesamtüberlebensrate. (Denis et al., 2004).
Es zeigte sich, dass eine Radiochemotherapie oraler Plattenepithelkarzinome die Zusammensetzung von Entzündungszellen in eine prognostisch günstige Richtung steuert (Tabachnyk et al., 2012). Insbesondere eine hohe Anzahl zytotoxischer T-Zellen und eine geringe Anzahl regulatorischer T-Zellen werden als vorteilhaft angesehen (Pagès et al., 2010).
Cisplatin bleibt der Eckpfeiler der Behandlung bei rezidiviertem und metastasiertem HNSCC. Darüber hinaus ist die gleichzeitige postoperative Gabe von hochdosiertem Cisplatin in Kombination mit einer Strahlentherapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem HNSCC wirksamer als eine alleinige Strahlentherapie und führt nicht zu einer übermäßigen Anzahl von Spätkomplikationen (Bernier et al., 2004).
Die Daten zeigen, dass eine Strahlentherapie in Kombination mit 5-Fluorouracil (5-FU), Cisplatin, Carboplatin und Mitomycin C als einzelnes Arzneimittel oder Kombinationen von 5-FU mit einem der anderen Arzneimittel unabhängig vom verwendeten Bestrahlungsschema zu einem Überlebensvorteil führt (Budach et al., 2006). Wenn die Strahlentherapie als einzelne Modalität angewendet wird, führt die Hyperfraktionierung zu einer signifikanten Verbesserung des Gesamtüberlebens (Budach et al., 2006). Eine akzelerierte Strahlentherapie allein, insbesondere wenn es als Split-Course-Bestrahlungsplan oder als extrem akzelerierte Behandlung mit verringerter Gesamtdosis verabreicht wird, erhöht nicht das Gesamtüberleben (Budach et al., 2006).

Palliative Chemotherapie

Die Palliativbehandlung kann nicht als Heilbehandlung angesehen werden, sobald die lokoregionale Behandlung fehlschlägt, sich Fernmetastasen entwickeln und eine Operation und/oder Bestrahlung nicht mehr möglich ist, wechselt die Behandlungsabsicht von kurativ zu palliativ. Patienten mit rezidivierter oder metastasierter Erkrankung haben bei bestmöglicher supportiver Behandlung ein mittleres Überleben von 4 bis 6 Monaten (Kim et al., 2002).

Zu den Empfehlungen für eine Chemotherapie bei palliativem HNSCC gehört die systemische Einzelwirkstoff- und Kombinationschemotherapie (NCCN-Richtlinien). Die aktivsten chemotherapeutischen Wirkstoffe, die in Einzelwirkstoffregimen verwendet werden, umfassen Cisplatin, Carboplatin, Paclitaxel, Docetaxel, 5-FU, Methotrexat und andere. Kombinationen von Chemotherapien sind jedoch auch mit einer höheren Toxizität verbunden (Forastiere et al., 1992, Clavel et al., 1994). Derzeit werden zahlreiche neue Wirkstoffe für die Behandlung von rezidiviertem, regional fortgeschrittenem und metastasiertem HNSCC untersucht. Zu den häufigsten untersuchten Wirkstoffen gehören Taxane und Ifosfamid gefolgt von Gemcitabin und Vinorelbin. Derzeit sind die auf Taxan/Platin basierenden Therapien mit hohen Ansprechraten und tolerierbaren Toxizitätsprofilen die vielversprechendsten (Khattab & Urba, 1999, Glisson et al., 2002).

Mehrere Phase-II-Studien machen deutlich, dass die Zugabe eines Taxans das Ansprechen auf 5-FU-basierte Induktionschemotherapie verbessert. Die Ergebnisse einer randomisierten Phase-III-Studie, in der die Induktionschemotherapie mit Docetaxel und 5-FU zusammen mit 5-FU allein verglichen wird, zeigen, dass der Einbau eines Taxans das klinische Ansprechen und das Überleben bei lokal fortgeschrittenem Kopf-Hals-Karzinom erheblich verbessert. Paclitaxel kann jedoch eine Neurotoxizität entwickeln und problematisch sein, insbesondere wenn es in Kombination mit anderen neurotoxischen Wirkstoffen wie Cisplatin angewendet wird (Posner, 2005, Galbiatti et al., 2013).

Cetuximab in Kombination mit Platin/5-FU hat sich aufgrund der Ergebnisse als First-Line-Behandlung von rezidivierten oder metastasierten Kopf-Hals-Tumoren etabliert (Bonner et al., 2010, Vermorken et al., 2008). Cetuximab kann in Kombination mit einer Chemotherapie in der Erstlinienbehandlung von

rezidivierenden oder metastasierenden Erkrankungen und in der Zweitbehandlung von platinresistenten Erkrankungen angewendet werden (Shin & Khuri, 2013).
Die Daten einer Phase-III-Studie stützen die Rolle von Cetuximab plus Strahlentherapie als wirksame Behandlungsoption für Patienten mit lokal fortgeschrittenem HNSCC (Bourhis et al., 2010). Darüber hinaus führt Cetuximab plus Strahlentherapie zu einer signifikanten Verbesserung der lokoregionalen Kontrolle und des Überlebens. Diese Überlebensverbesserungen können langfristig aufrechterhalten werden, wobei Cetuximab plus Strahlentherapie einen Vorteil von neun Prozentpunkten in der 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie aufweist. Die Kombination von Cetuximab und gleichzeitiger Radiochemotherapie wird derzeit in Phase-III-Studien untersucht. Der Einbau von Cetuximab in aufeinanderfolgende Chemotherapie- und Strahlentherapie-/Radiochemotherapie-Behandlungsschemata liefert interessante Ergebnisse. Nach der Induktionschemotherapie wird die Kombination von Cetuximab und Strahlentherapie besser vertragen als die gleichzeitige Chemoradiotherapie auf Platinbasis mit einer ähnlichen Kurzzeitrate der Kehlkopfkonservierung (Bourhis et al., 2010).
Wichtig ist, dass sich die Patienten der palliativen Behandlung der Chemotherapie sowie des toxischen Potenzials und der zusätzlichen Kosten der Chemotherapie bewusst sind. HNSCC erfordert eine sehr sorgfältige und wichtige multimodale Versorgung, einschließlich Ernährungsunterstützung, Sprach- und Schlucktherapie, Sozialarbeiter, Seelsorger, Psychologen und Psychiater (Martinez et al., 2004).

Salvage Chirurgie

Trotz zunehmender Verbesserungen der nicht-chirurgischen Behandlungsmodalitäten bei Kopf-Hals-Tumoren kommt es bei diesen konservativen Therapien häufiger zu Tumorrezidiven. In diesen Fällen ist die Rettungs-Chirurgie/Salvage-Chirurgie die letzte verbleibende kurative Option.
Durch immer besser werdende plastische Rekonstruktionen und Erweiterung des operativen Spektrums im Kopf-Hals-Bereich sowie der Verbesserung der Salvage-Chirurgie ist es möglich rezidivierte Kopf-Hals-Karzinome zu operieren. Der Erfolg hängt hierbei stark vom Tumorstadium des Rezidivs sowie vom Stadium der Erstdiagnose ab (Stuck et al., 2017).

Das Problem der Salvage-Chirurgie ist eine erhöhte Komplikationsrate hinsichtlich der Wundheilung. Die aggressive primäre Therapie verursacht Gewebsschäden, die für eine physiologische Wundheilung problematisch sind. So führt die Bestrahlung nicht nur dem Karzinom Schäden zu, es werden auch Gefäßfunktionen der gesunden Bereiche geschädigt und Fibrosen verursacht (Miller & Rudolph, 1990).
Dies führt zur verminderten Sauerstoffversorgung, wodurch die Wundheilung negativ beeinträchtigt wird (Marx & Ames, 1982).
Daher ist zum Beispiel die Salvage-Laryngektomie nach konventioneller RT mit einem erhöhten Risiko für Wundheilungsstörungen und systemischen Komplikationen verbunden (Sarkar et al., 1990, Joseph & Shumrick, 1973, Johansen et al., 1988, Van den Bogaert et al., 1984). In Goodwins umfassender Übersicht über Komplikationen nach Salvage-Chirurgie für Krebserkrankungen des oberen Aerodigestivtrakts liegt die Hauptkomplikationsrate bei 27 % (Goodwin, 2000). Die häufigste Komplikation nach einer Salvage-Laryngektomie ist die pharyngokutane Fistel. Die Inzidenz von Fisteln ist unabhängig vom zeitlichen Abstand zwischen Erstbehandlung und Salvage-Laryngektomie oder der Art der Erstbehandlung. Die meisten Fisteln heilen durch lokale Wundversorgung aus und sind nicht mit einer übermäßigen postoperativen Mortalität verbunden (Weber et al., 2003).

Prognose

Die Prognose eines Kopf-Hals-Karzinoms hängt von vielen Faktoren ab. In erster Linie spielt die anatomische Ausbreitung des Tumors eine große Rolle bei der Prognose bezogen auf den Überlebenszeitraum des Patienten. Auch das Grading, die Differenzierung des Tumors, ist wichtig um eine Aussage über die Prognose treffen zu können. Heutzutage wird die Prognose anhand eines UICC-Prognosefaktoren-Gitters bestimmt (Tab. 4) (Wittekind, 2017).
Seit 1990 besteht ein Trend zur Bestrahlung ohne Operation, der die 5-Jahres-Überlebensraten bei Hypopharynxkarzinom verbessert.
Das durchschnittliche Überleben von Patienten mit Hypopharynxkarzinom ist im Zeitraum zwischen 1990 und 2003 auf 41,3 % angestiegen von 37,5% bei den von 1973 bis 1989 diagnostizierten Patienten (Newman et al., 2015).

Tabelle 4: Prognosefaktoren (Wittekind, 2017)

Prognosefaktoren	Tumor-bezogen	Wirt-bezogen	Umwelt-bezogen
Essentielle	Anatomische Ausbreitung Histologischer Typ	Alter	Verfügbarkeit oder Zugang zu einer Strahlentherapie
Zusätzliche	Tumormasse, Tumormarker, Programmierter-Zelltod-Rezeptor und seine Liganden	Ethnie, Geschlecht, Herzfunktion	Expertise in der Behandlung in bestimmten Bereichen (z.B. Chirurgie, Strahlentherapie etc.)
Neu und vielversprechend	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor Genexpressionsprofil	Keimbahnmutation-p53	Zugang zu Informationen

1.6 Immuncheckpoint Grundlagen

Unter physiologischen Bedingungen sind Immun-Checkpoints entscheidend für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz. Immun-Checkpoints beugen einer Autoimmunität vor und schützen dadurch das Gewebe bei einer pathogenen Infektion vor Schäden durch das eigene Immunsystem. Karzinome verursachen zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen. Hierdurch entstehen Antigene, anhand derer das Immunsystem Tumorzellen von gesunden Zellen unterscheiden kann. Das Ausmaß und die Qualität der Immunantwort, ausgelöst durch Antigenerkennung mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors (TCR), wird durch ein Gleichgewicht zwischen co-stimulierenden und co-inhibitorischen Signalen reguliert (Greenwald et al., 2005). Die Aktivierung spezifischer T-Zellen wird entweder durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) über MHC-II oder durch Tumorzellen über MHC-I induziert. Ein co-stimulierendes Signal, z.B. CD28, und ein aktivierendes Cytokin-Milieu sind ebenfalls erforderlich. Die T-Zell-Aktivierung kann durch eine Vielzahl von Checkpoint-Molekülen reguliert werden, z.B. CTLA-4, PD-1, OX-40 und CD27 (Abb. 1).

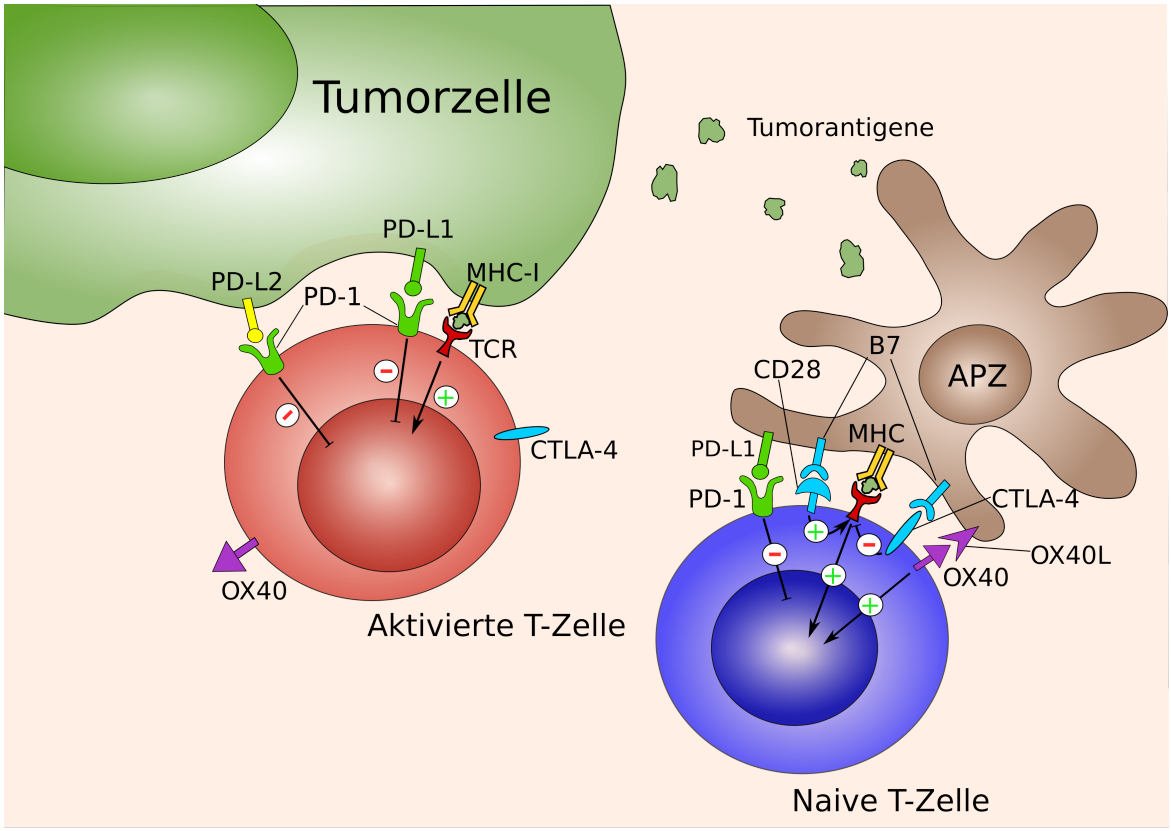

Abbildung 1 Die Aktivierung spezifischer T-Zellen wird entweder durch Antigen-präsentierende Zellen über MHC-II oder durch Tumorzellen über MHC-I induziert. Ein co-stimulierendes Signal, z.B. CD28 und ein aktivierendes Cytokin-Milieu sind ebenfalls erforderlich. Die T-Zell-Aktivierung kann durch eine Vielzahl von Checkpoint-Molekülen reguliert werden, z. CTLA-4, PD-1, OX-40 und CD27.
Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von [Springer Nature]: [HNO] [Immunotherapy of head and neck tumors: Highlights of the ASCO Meeting 2015 Laban, S., Doescher, J., Schuler, P. J., Brunner, C., Veit, J. A., Hoffmann, T. K., & Bullinger, L] [©2015] (Laban et al., 2015)

Die Expression von Immuncheckpoint-Rezeptoren und Liganden kann durch Tumore als wichtiger Immunresistenzmechanismus genutzt werden. Dies hat zur Folge, dass die Karzinomzellen nicht mehr durch das Immunsystem erkannt und eliminiert werden (Pardoll, 2012).

Daher stehen vor allem T-Zellen aufgrund einiger Faktoren im Mittelpunkt der therapeutischen Manipulation der körpereigenen Antitumorimmunität.

Sie können selektiv Peptide erkennen, die aus Proteinen aller Zellkompartimenten stammen, Antigen-exprimierende Zellen direkt identifizieren und abtöten (durch CD8 positive-Effektor-T-Zellen auch als cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) bekannt) und durch CD4 positive-Helfer-T-Zellen Immunantworten auslösen (Pardoll, 2012).

Immun-Checkpoint-Inhibitoren zeigen ein großes therapeutisches Potenzial für HNSCC. Vor fünf Jahren wurden noch keine Studien zu Immun-Checkpoints für HNSCC registriert (Laban et al., 2015). Heute basiert die Mehrzahl der Studien auf dieser Gruppe von Antikörpern mit ermutigenden Ergebnissen im klinischen Umfeld.

Dies spiegelt sich in der exponentiellen Zunahme der Veröffentlichungen zu diesem Thema wider (Schuler et al., 2017).

1.7 Neue Therapieansätze

Die Krebsimmuntherapie basiert auf der Prämisse, dass Tumore durch das Immunsystem eher als fremd und nicht als körpereigen erkannt werden und von einem aktivierten Immunsystem effektiv angegriffen werden können.

Heutzutage ist die am weitesten verbreitete Form der Krebsimmuntherapie die monoklonale Antikörper (moAb) Therapie. Die monoklonale Antikörper-Therapie beinhaltet Tumorantigen (TA) zielgerichtete moAbs, Cytokin zielgerichtete moAbs, co-stimulatorisch zielgerichtete moAbs der Tumornekrosefaktor Rezeptor Familie (TNFR) und auf Immun-Checkpoint ausgerichtete moAbs (Ferris, et al., 2010). Das am umfassendsten untersuchte Arzneimittel der moAbs ist Cetuximab, ein chimäres Maus-Mensch-Immunglobulin G1 (IgG1) Anti-EGFR-moAb (Yewale, et al., 2013). EGFR ist ein attraktives Ziel bei HNSCC, da es in 80 % bis 90 % der HNSCCs überexprimiert wird und zur Proliferation und Invasion von Tumorzellen, Angiogenese sowie Tumorüberleben führt, wodurch die Prognose verschlechtert wird und die Überlebensrate sinkt (Grandis et al., 1998).

Anti-EGFR-moAbs vermitteln Antigen-spezifische Immunantworten auf gezielten Tumoren durch zwei Hauptmechanismen: direkte Abtötung über lytische Immunzellen (NK-Zellen oder Monozyten) und Komplementfixierung oder Opsonisierung des Tumors für Phagozytose und anschließende Antigenverarbeitung. Letzteres induziert TA-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs), um Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren. Eine Methode, mit der Antikörper eine Tumorlyse verursachen können, ist die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität, die durch NK-Zellen und wahrscheinlich Monozyten und neutrophile Granulozyten vermittelt wird. Zusätzlich zur direkten Aktivierung der NK-Zelllyse von Tumorzellen können TA-spezifische moAbs durch Wechselwirkung mit FcRs auf Antigen-präsentierenden Zellen CD8-T-Zell-Antworten auf von Tumoren abgeleitete Antigene auslösen.

Bei Patienten mit HNSCC, die mit Cetuximab allein oder in Kombination mit einer Cisplatin-Chemotherapie behandelt wurden, konnte eine spezifische T-Zell-Aktivierung nachgewiesen werden (Lee, et al., , 2011, Srivastava et al., 2013).

Diese spezifische T-Zell-Aktivierung durch immunmodulatorische Therapien stellt

vielversprechendes therapeutisches Potential für HNSCC Patienten dar.
So ergaben Untersuchungen, dass eine RCT bei HNSCC die Frequenz von zirkulierenden CD4 positiven T-Zellen verringert, jedoch die Frequenz von CD4 positiven CD39 positiven Treg im Vergleich zu unbehandelten oder nur operierten Patienten erhöht (Schuler et al., 2013).
Daher haben immunmodulatorische Therapien, die immunsuppressive Signale bei Patienten mit HNSCC unterdrücken, vielversprechende therapeutische Wirkungen. Die kürzlich erwiesene klinische Wirksamkeit der von der US-amerikanischen Food and Drug Administration zugelassenen moAbs gegen Immun-Checkpoint-Rezeptoren, einschließlich Anti-CTLA-4 und Anti-Programmed Death-1 (Anti-PD-1), verspricht weitere Vorteile für Patienten.
Des Weiteren gibt es Krebsimpfstoffe, bei denen Tumorpeptidantigene oder virale, bakterielle und DNA-basierte Vektoren verwendet werden (Ferris, 2015).

1.7.1 PD-1/PD-L1

Die Hauptaufgabe von PD-1 liegt darin, die Aktivität von T-Zellen in der Peripherie während einer Entzündungsreaktion auf die Infektion zu begrenzen und eine Autoimmunität zu minimieren (Keir et al., 2008, Linsley et al., 1990, Peggs et al., 2009). Die Grundlage für dieses Reaktionsspektrum ist, dass die Liganden für PD-1, PD-L1/B7-H1 und PD-L2/B7-DC (Latchman et al., 2001, Tseng et al., 2001) als Reaktion auf eine Entzündung hochreguliert werden. PD-L1 wird bei vielen Zelltypen, hämatopoetischen, endothelialen und epithelialen, als Reaktion auf entzündungsfördernde Zytokine, insbesondere Interferon-Gamma, hochreguliert, während PD-L2 bei dendritischen Zellen und Makrophagen als Reaktion auf verschiedene entzündungsfördernde Zytokinen, wie IL-4, hochreguliert wird (Wilke et al., 2011, T. Shin et al., 2005).
PD-1 wird auf aktivierten T-Zellen in unterschiedlichem Maße exprimiert, somit wirkt die Co-Expression von Ligand und Rezeptor in entzündeten Geweben einer Zerstörung des umliegenden Gewebes durch T-Zellen an diesen Stellen entgegen. Entsprechend dieser biologischen Rolle entwickeln PD-1- und PD-L1-knock-out-Mäuse im ersten Lebensjahr keine spontanen Autoimmunreaktionen, zeigen jedoch verstärkte Reaktionen des Gewebes auf eine Infektion (Topalian et al., 2012).
T-Zellen, die während des Krebsgeschehens und bei anhaltenden Infektionen chronisch Antigenen ausgesetzt sind, neigen zu einem Phänotypenwechsel, bei

dem ihre Effektorfunktionen erheblich beeinträchtigt werden, wodurch das Fortschreiten der Krankheit ermöglicht wird. Diese erschöpften oder dysfunktionalen T-Zellen sind nicht in der Lage, persistierende Tumore und Krankheitserreger optimal zu kontrollieren, was zum Teil auf die anhaltende Expression von co-inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1 zurückzuführen ist (Wherry & Kurachi, 2015).
Durch Blockierung der Interaktion von PD-1 mit seinen Liganden PD-L1 und PD-L2, die entweder von Tumorzellen oder Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert werden, können die Effektorfunktionen erschöpfter T-Zellen zumindest teilweise neu belebt werden, um eine schützende Immunität zu gewährleisten (Pauken et al., 2016).
Innerhalb der Klinik werden therapeutisch monoklonale Antikörper eingesetzt, wobei sich die gezielte Behandlung des PD-1/PD-L1-Signalwegs als äußerst wirksam erwiesen hat. Bei einer Reihe von Krebstypen sind Berichte über dauerhafte Reaktionen veröffentlicht worden (Chen & Mellman, 2017).
Obwohl die Wirksamkeit und Handhabbarkeit bei einem erheblichen Anteil der Patienten höher ist als bei den herkömmlichen und gezielten Krebstherapien, gibt es Patienten, die überhaupt nicht auf PD-1/PD-L1-Blockade ansprechen oder mit der Zeit therapeutische Resistenz erlangen (Zaretsky et al., 2016, Ribas et al., 2016,O'Donnell et al., 2017).

Bei HNSCC-Tumoren wird berichtet, dass 45 % – 80 % PD-L1 exprimieren und damit ein erfolgreicher Immun-escape entsteht (Zandberg & Strome, 2014).
Darüber hinaus kann die Exposition von HNSCC-Zellen gegenüber einer Therapie zu einer Heraufregulierung von PD-L1 auf Tumorzellen führen. So wurde beobachtet, dass HNSCC-Patienten eine im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte PD-L1-Expression in peripheren mononukleären Blutzellen aufweisen (Parikh et al., 2014).
Außerdem können HNSCC-Zellen auf die Behandlung mit Cetuximab mit der Rekrutierung von CD4 positiven FOXP3 positiven -Treg reagieren, die zudem CTLA-4, CD39 und TGFβ exprimieren, was zur Unterdrückung der Cetuximab-vermittelten Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) führt und die Prognose ungünstig beeinflusst (Agrawal et al., 2011). Präklinische Daten deuten darauf hin, dass eine CTLA-4-Blockade mit dem monoklonalen Antikörper Ipilimumab die Cetuximab-Empfindlichkeit wiederherstellen könnte (Schoppy &

Sunwoo, 2015).

Die beiden PD-1 Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab wurden auf der Basis großer Phase-3 Studien in den letzten Jahren zugelassen.

In der ersten Studie wurden im Verhältnis 2:1 361 Patienten mit rezidiviertem/metastasiertem HNSCC, deren Krankheit innerhalb von sechs Monaten nach einer platinbasierten Chemotherapie fortgeschritten war, entweder alle zwei Wochen mit Nivolumab (in einer Dosis von 3 mg pro Kilogramm Körpergewicht) oder mit einer standardmäßigen systemischen Einzelwirkstofftherapie (Methotrexat, Docetaxel oder Cetuximab) behandelt. Das mediane Gesamtüberleben betrug 7,5 Monate in der Nivolumab-Gruppe gegenüber 5,1 Monaten in der Gruppe, die eine Standardtherapie erhielt. Das Gesamtüberleben war damit unter Nivolumab signifikant länger als unter Standardtherapie (p= 0,01), und die Schätzungen der 1-Jahres-Überlebensrate sind mit Nivolumab um etwa 19 Prozentpunkte höher als bei Standardtherapie (36,0 % gegenüber 16,6 %). Behandlungsbedingte unerwünschte Ereignisse Grad 3 oder 4 traten bei 13,1 % der Patienten in der Nivolumab-Gruppe gegenüber 35,1 % der Patienten in der Standardtherapiegruppe auf (Ferris et al., 2016).

In der zweiten wichtigen Studie wurden 882 Teilnehmer zwischen dem 20. April 2015 und dem 17. Januar 2017 in drei Therapiearme randomisiert: Pembrolizumab allein (n = 301), Pembrolizumab plus Platin und 5-Fluorouracil (n = 281) oder Cetuximab plus Platin und 5-Fluorouracil (n = 300).

Basierend auf der beobachteten Wirksamkeit und Sicherheit konnte, in Abhängigkeit des PD-L1 Status, Pembrolizumab alleine sowie in Kombination mit Cisplatin und 5-Fluorouracil als geeignete Erstlinienbehandlung für das rezidivierte und/oder metastasierte HNSCC etabliert werden (Burtness et al., 2019).

1.7.2 CD27

CD27, auch bekannt als Tumor necrosis factor receptor superfamily member 7 (TNFRSF7), ist ein Typ I-Membranprotein und ein Mitglied der TNFR-Familie.

Murines und menschliches CD27 wird auf T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen exprimiert (Gravestein et al., 1995, Klein et al., 1998, Sugita et al., 1992, van Lier et al., 1987).

Ein einzigartiges Merkmal von CD27 unter den Mitgliedern der TNFR-Familie ist seine konstitutive Expression auf der Mehrheit der T-Zellen, was darauf hindeutet,

dass CD27 eine Rolle beim Priming von T-Zellen spielen könnte. Naive T-Zellen exprimieren konstitutiv CD27, und das T-Zell-Rezeptor-Signal (TCR) reguliert die CD27-Expression weiter (de Jong et al., 1991).
CD27 wird teilweise auch von NK-Zellen exprimiert. Bei Mäusen differenziert die CD27-Expression den reifen CD11b-High-NK-Zellpool in zwei funktionell unterschiedliche Untergruppen. Die CD27high NK-Zelluntergruppe hat eine größere Effektorfunktion im Vergleich zu CD27low NK-Zellen (Hayakawa & Smyth, 2006). Beim Menschen ist der Verlust von CD27 auf NK-Zellen mit einer erhöhten Zytotoxizität verbunden (Vossen et al., 2008). Wichtig ist, dass CD27 sowohl von Effektor- als auch von regulatorischen T-Zellpopulationen an Entzündungs- und Krebsherden exprimiert wird, was darauf hinweist, dass beide T-Zellpopulationen potenzielle Ziele für die CD27-Immunmodulation sind.
CD70 ist der einzige bekannte Ligand von CD27. Die Wechselwirkung zwischen CD27 und seinem Liganden CD70 liefert ein co-stimulatorisches Signal für die T-Zellexpansion. Unter physiologischen Bedingungen stellt die enge Regulation der CD70-Expression die vorübergehende Verfügbarkeit dieses co-stimulatorischen Signals auf aktivierten APCs, T-Zellen und NK-Zellen sicher. Auf humanen peripheren APC fehlt CD70 im Ruhezustand, wird aber durch TNF-α, TLR-Agonisten (Toll-like-Rezeptoren) oder Bestrahlung hochreguliert (Huang et al., 2011, Krause et al., 2009, Oosterhoff et al., 2013).
Auf T-Zellen liefert die gleichzeitige Bindung des TCR durch MHC/Peptid und CD27 durch CD70 ein wichtiges Signal für die T-Zellexpansion.
Mäuse, die CD70 auf B-Zellen oder DCs konstitutiv exprimieren, haben eine höhere Anzahl von peripheren T-Zellen und ein größerer Prozentsatz sind aktivierte Effektor-T-Zellen (Arens et al., 2001, Keller et al., 2008). Des Weiteren exprimiert eine Untergruppe von NK-Zellen CD27 und die Bindung von CD27 führt zur Proliferation von NK-Zellen und zur IFNγ-Produktion (Takeda et al., 2000).

Die Antitumorwirkung des CD27-Signalwegs wurde in mehreren Maus-Tumormodellen gezeigt. In einem Maus-B-Zell-Lymphom-Modell hob die Blockierung der CD27-Costimulation durch Verwendung eines mAb gegen CD70 den therapeutischen Anti-CD40-mAb-Effekt vollständig auf, da die CD8-T-Zell-Expansion stark beeinträchtigt wurde. Darüber hinaus konnte in zwei verschiedenen Lymphom-Modellen gezeigt werden, dass ein agonistischer Anti-CD27-mAb, der als

einzelnes Reagenz verabreicht wurde, tumortragende Mäuse vollständig schützen kann (French et al., 2007). In einem etablierten Maus-Melanom-Modell führt der agonistische Anti-CD27-Antikörper als Monotherapie zu einer wesentlichen Verringerung des Auswachstums sowohl von subkutanen Tumoren als auch von experimentellen Lungenmetastasen. Einige mögliche Mechanismen umfassen das Überleben tumorspezifischer CD8 positiver T-Zellen, die Verringerung der Häufigkeit von Treg in Tumoren und die Verbesserung der Funktion von NK-Zellen und CD8 positiver CTLs (Roberts et al., 2010). In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde das Potenzial einer Anti-CD27-Monotherapie für die Krebsimmuntherapie in Mausmodellen für Lymphome nachgewiesen (Turaj et al., 2017). In dieser Studie wurde ein erweitertes Panel immunmodulatorischer mAbs entweder als einzelnes Mittel oder in Kombination mit dem direkten Tumor-Targeting-mAb Anti-CD20 zur Behandlung von Maus-Lymphomen verwendet. Unter allen getesteten immunmodulatorischen mAbs, zeigten sich nur Anti-4-1BB und Anti-CD27 Wirksamkeit als Einzelreagenz. Bemerkenswerterweise führte die Kombination von Anti-CD20 / CD27 zur vollständigen Heilung. Dieser Effekt war sowohl in multiplen Lymphom-Modellen als auch in humanen CD27-transgenen Mäusen unter Verwendung des antihumanen CD27-mAb Varlilumab zu beobachten. Eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung zeigte, dass Anti-CD27 CD8 positive T- und NK-Zellen stimuliert, um myeloide Lockstoffe und IFN-γ freizusetzen, damit eine myeloide Infiltration und Makrophagenaktivierung ausgelöst wird. Diese Studie offenbart den therapeutischen Vorteil der Verwendung eines immunmodulatorischen mAb zur Regulierung lymphoider Zellen, die dann myeloide Zellen rekrutieren und aktivieren, um die Abtötung von mAb-opsonisierten Tumoren zu verbessern.

Varlilumab (CDX-1127) ist ein vollständig menschlicher mAb, der auf CD27 abzielt und dieses stimuliert. Sowohl in In-vitro-Tests als auch in vorklinischen In-vivo-Modellen zeigte Varliumab eine direkte Antitumoraktivität gegen ein CD27-exprimierendes Lymphom oder eine Leukämie, indem Effektor-T-Zellen stimuliert und T-regulatorische Zellen angereichert wurden (Ramakrishna et al., 2015, Vitale et al., 2012). Darüber hinaus machte Varlilumab in Kombination mit einer Anti-CD20- oder PD-1/PD-L1-Blockade bei präklinischen Lymphom- und Melanom-Tumormodellen synergistische Effekte deutlich. Eine Phase-I-Studie mit Varlilumab bei Patienten mit soliden Krebserkrankungen und hämatologischen malignen

Erkrankungen legte dar, dass Varlilumab gut verträglich ist und eine Antitumorwirksamkeit aufweist (Burris et al., 2017). Derzeit laufen weitere klinische Studien mit Varlilumab als Krebstherapeutikum (Han & Vesely, 2019).

1.8 Zielsetzung

Bislang gibt es vereinzelte Studien zu verschiedenen Tumorentitäten, welche Veränderungen des Immunsystems unter Radiochemotherapie betrachtet haben. Hier lag der Fokus vor allem auf der Beobachtung der Immunzellzahl im Blut und Tumorgewebe (Sridharan et al., 2016, Sadahiro et al., 2010, Tabachnyk et al., 2012, Schuler et al., 2013). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte eine Änderung der PD-L1 Expression auf Tumorzellen unter RCT beim Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinom gezeigt werden (Fujimoto et al., 2017). Für Zervixkarzinome wurde eine Zunahme der PD-1 Expression auf CD4 positive T-Zellen beobachtet (van Meir et al., 2017). In einer weitreichenden Literaturrecherche vor Beginn des hier vorgestellten Projekts konnten keine weiteren Publikationen mit einem vergleichbaren Betrachtungswinkel gefunden werden. Die Ergebnisse der geplanten Untersuchungen sind für eine Personalisierung der Therapie von KHT von hoher Relevanz und, mit Einschränkungen, auch auf andere epitheliale Tumore übertragbar.

Ziel des Projektes war es, Therapieversager (Non-Responder) auf eine primäre Radiochemotherapie bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomen näher zu untersuchen. Hierfür sollten die Tumore dieser Patienten auf Proteinebene bezüglich der Expression von **CD27, PD-1** und **PD-L1** vor und nach Radiochemotherapie charakterisiert werden.

Folgende Fragen sollen untersucht werden:

Ändert sich die Expression verschiedener immunsuppressiver und immunstimulierender Moleküle des Immunzellinfiltrats im Tumorgewebe unter Radiochemotherapie?

Unterscheiden sich diese Expressionsmuster zwischen Respondern und Non-Respondern?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Insgesamt werden 200 Patienten für die vorliegende retrospektive Studie identifiziert. Nach Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien verbleiben n=67 zur Analyse. Alle Patienten werden primär in der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik des Universitätsklinikums Ulm diagnostiziert und mit einer primären Radiochemotherapie an verschiedenen Orten behandelt.

2.1.1 Einschlusskriterien

In die Studie können alle Patienten mit der histologisch gesicherten Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich aus den Jahren 2006 bis 2016, die mit einer primären Radiochemotherapie behandelt werden, eingeschlossen werden. Für einen Einschluss muss zudem archiviertes Tumormaterial prä- und posttherapeutisch im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm vorhanden sein.

2.1.2 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen werden Patienten mit Nasopharynxtumoren, mit Vorliegen eines Zweitkarzinoms sowie Patienten mit Biopsien aus externen Einrichtungen.

2.1.3 Material

Zur Verfügung steht formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes archiviertes Tumormaterial (FFPE), welches im Rahmen einer Panendoskopie vor und nach Radiochemotherapie gewonnen wird. Die post-therapeutische Probe wird aus der ehemaligen Tumorregion, bzw. einem makroskopisch ersichtlichen Tumorresiduum entnommen.

2.2 Schnittanfertigung

2.2.1 Schneiden

Für lichtmikroskopische Routinepräparate werden Paraffinblöcke in 1,5 – 2 Mikrometer dicke Scheiben geschnitten. Das Schneiden der Gewebeblöcke erfolgt

mittels eines Mikrotoms. Anschließend werden die Schnitte auf einen Objektträger aus Glas gezogen (Welsch & Deller, 2010).

2.2.2 Vorbehandlung der Schnitte

Die Entparaffinierung läuft bei allen Schnitten identisch ab. Jeweils 20 Schnitte werden in ein gläsernes Färbegestell gegeben. Dieses Gestell durchläuft drei Xylolbäder, in welchen es jeweils für 5 Minuten gelagert werden muss. Anschließend wird das Färbegestell mit 100-%-igem Alkohol gespült, um die Reste der Xylolbäder von den Schnitten vollständig zu entfernen. Das Färbegestell wird im Anschluss in einem weiteren 100-%-igen Alkoholbad für 5 Minuten gelagert.
Nach Ablauf der 5 Minuten wird das Gestell für weitere 5 Minuten in 90-%-igem Alkohol gelagert. In 70-%-igem Alkohol wird es dann weitere 5 Minuten aufbewahrt. Bevor die Schnitte aus dem Färbegestell in den Dako Autostainer gegeben werden können, müssen diese mit destilliertem Wasser gespült werden.

Die weitere Vorbehandlung hängt vom Antikörper ab, der bei der darauffolgenden Immunfärbung verwendet wird.
So werden die Antikörper CD27 und PD-L1 im Steamer vorbehandelt. Bei der Steamer Vorbehandlung werden die Schnitte in die vorgeheizte Pufferlösung gegeben. Für PD-L1 wird EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) mit einem pH von 9 und bei CD27 mit einem pH von 8 verwendet. Anschließend werden die Schnitte für 20 Minuten inkubiert. In dieser Zeit ist es wichtig, den Wasserstand des Steamers zu kontrollieren.
Sobald die Inkubation beendet ist, werden die Küvetten für 10 Minuten in einem Eisbad gelagert und abgekühlt. Danach werden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült.
Der Antikörper PD-1 wird in der Mikrowelle vorbehandelt. Die Schnitte werden dazu in Citratpuffer (10mM pH 6) gelegt.
Die Küvette wird für 20 Minuten auf einer Plastikschale in die Mikrowelle gestellt. Alle 3 Minuten wird destilliertes Wasser nachgefüllt, da der Citratpuffer durch die Hitze in der Mikrowelle verdunstet und die Schnitte durchgehend mit Flüssigkeit bedeckt sein müssen. Dieser Vorgang wird so lange durchgeführt bis die 20 Minuten erreicht sind.

2.2.3 Etablierung der Färbung

Die Etablierung der Färbung wird durchgeführt, um die passende Verdünnung für die jeweiligen Antikörper anhand von Plazenta- und Tonsillenpräparaten zu finden. Nachdem die Vorbehandlung durchgeführt ist, werden die Schnitte vor Beginn der Färbung mit einem PAP Pen markiert, um ein Ablaufen des Antikörpers vom Gewebe zu vermeiden, und in einen PBS Puffer gestellt. Danach wird der Primärantikörper in verschiedenen Verdünnungen mit einer Pipette (100 Mikrometer) aufgetragen und 30 Minuten inkubiert. CD27 wird in folgenden Verdünnungen getestet: 1:50 1:100, 1:200, 1:500. Bei PD-L1 werden die Verdünnungen 1:100 und 1:400 getestet, bei PD-1 1:100 und 1:50.
Für die endgültigen Färbungen wählen wir die Verdünnung für CD27 1:500, PD-L1 1:200 und PD-1 1:50.

Nach 30 Minuten wird der Primärantiköper im PBS Puffer gespült. Nun folgt die ABC Methode: der Sekundärantiköper 30 Minuten inkubiert und anschließend mit PBS Puffer abgespült. Nun wird Streptavidin aufgetragen und 30 Minuten inkubiert und daraufhin wieder mit Puffer gespült. Anschließend wird RED auf den Objektträger aufgetragen und 16 Minuten inkubiert. Nach den 16 Minuten wird mit destilliertem Wasser gespült. Abschließend wird der Schnitt 5 Minuten mit Hämalaun angefärbt. Nach diesem letzten Schritt werden die Schnitte mit Wasser gespült und mit Deckgläsern und Aquatex eingedeckt.

2.2.4 Färbung der Schnitte

Nachdem die optimalen Verdünnungen gefunden sind, kann die Färbung der gesamten Gewebeproben der Probanden beginnen. Dabei werden immer 23 Patientenproben in einem Durchgang gefärbt. Eine Patientenprobe besteht jeweils aus einer Biopsie des Gewebes aus der Erstdiagnose (Präbiopsie) und einer Biopsie des Gewebes nach der Chemotherapie (Postbiopsie).
Es sind pro Färbungsdurchgang 46 Schnitte im Dako Autostainer. Die Schnitte werden alle für die jeweiligen Antikörper wie oben beschrieben vorbehandelt. Nach der passenden Vorbehandlung kommen die Schnitte in den Autostainer. Anschließend wird alles für die Färbung vorbereitet.
Wichtig ist dabei zunächst die Überprüfung der einzelnen Behälter. Zum Einen muss das Pufferbehältnis sowie das Aqua dest. Behältnis auf die richtige Füllmenge

geprüft werden. Des Weiteren ist zu prüfen, ob der Abfallbehälter geleert ist. Anschließend müssen die Antikörper, die Sekundärantikörper und das Streptavidin in den dafür vorgesehenen Ständer gestellt werden.
Das Chromogen RED wird erst 10 Minuten bevor es auf die Objekträger aufgetragen wird, angemischt und zusammen mit dem Hämalaun in den Autostainer gestellt, sobald dieser das Signal dafür gibt.
Die anzumischenden Mengen hängen von der Anzahl der zu färbenden Schnitte sowie der Verdünnung des Antiköpers und der Menge der aufgetragenen Antikörper auf die Objektträger ab. Diese Mengen werden exakt vom Computer berechnet.
Nachdem der Färbevorgang im Autostainer beendet ist, werden die Objektträger in destilliertes Wasser gestellt. Anschließend sind die Objektträger mit Deckgläsern und Aquatex einzudecken.

2.3 Immunhistochemie

Bei dieser Methode werden in den Schnitten bestimmte Peptide oder Proteine mit Hilfe von Antigen-Antikörper-Reaktionen sichtbar gemacht.
Die im Gewebe zu markierende Struktur, das Antigen, soll mit Hilfe eines Antiköpers markiert werden. Dazu wird eine Lösung mit einem spezifischen Antiköper für das Antigen auf die Gewebeprobe aufgetragen und inkubiert.
Der Antikörper wird dort binden, wo das Antigen in der Zelle vorkommt. Das kann zum Beispiel im Zytoplasma oder in der extrazellulären Matrix geschehen.
Um diese Reaktion für den Untersucher sichtbar zu machen, gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder kann der Antiköper mit einer fluoreszierenden Substanz markiert sein oder er wird durch eine zweite Reaktion, mittels eines Sekundärantiköpers, sichtbar gemacht.
Dieser Sekundärantiköper ist mit einem Enzym markiert und dieses kann mit klassischen enzymhistochemischen Methoden sichtbar gemacht werden (Welsch & Deller, 2010).

2.4 Material

2.4.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Auflistung der Verbrauchsmaterialien mit Hersteller, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016

Produkt	**Produkt Name/Hersteller**
Steamer	Tefal Vitacuisine compact
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	ZYTOMED HIER T_EDTA BUFFER pH 9 (10x)
PAP Pen	DAKO Pen
Primärantikörper	CD27: NovaCastra NCL-CD27 PD-L1: (E1L3N®) XP® Rabbit aAb Cell Signaling Technology PD-1: Dianova PD-1 NAT105 und Anti-PD-1 (Hu) aus Maus (KonJAD1)
Sekundärantikörper	Biotinylated Secondary Antibodies: Dako Real™ Detection System Alkaline Phosphatase/RED Rabbit/Mouse
Färbemaschine	Dako Autostainer 2.4.1.1 Universal Staining System
RED	Chromogen RED 1 Chromogen RED 2 Chromogen RED 3 Antibodies Dako Real™ Detection System Alkaline Phosphatase/RED Rabbit/Mouse
Aquatex®	Microscopy aquatex Merck KGaA
Objektträger	SuperFrost®Plus VWR International bvba
Deckgläser	VWR 24x50mm Menzel-Gläser 24x60

2.4.2 Elektronische Datenverarbeitung

Tabelle 6: elektronische Datenverarbeitung, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016

Software	Version
Microsoft® Word für Mac 2011	Version 14.0.0
Microsoft® Excel für Mac 2011	Version 14.0.0
IBM® SPSS® Statistics	Version 24.0.0.0

2.5 Methoden

2.5.1 Ethikantrag

Vor Beginn der Studie ist der Antrag Nr. 448/17 (siehe Anhang) für die Erlaubnis zur Durchführung der Arbeit an die Ethikkommission der Universität Ulm gestellt und mit einem positiven Votum genehmigt worden.

2.5.2 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Daten wird das Programm SPSS verwendet (Tab. 6).

Um den Expressionsstatus vor und nach RCT zu untersuchen, wird ein gepaarter T-Test herangezogen. Dabei wird geprüft, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen Zellexpressionen vor und nach der RCT besteht.

Ein ungepaarter T-Test wird herangezogen, um herauszufinden, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Therapieansprechern und den Therapieversagern hinsichtlich ihrer Antikörper Expression vor und nach der RCT gibt.

Um zu untersuchen, wovon Veränderungen der Expression abhängen können, wird mittels Kruskal-Wallis-Test der Zusammenhang zwischen dem Expressionsstatus und der Art des Chemotherapeutikums untersucht.

Welchen Einfluss der Expressionsstatus auf das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben der Patienten hat, wird anhand der Kaplan-Meier-Analyse mittels Log-Rank-Test analysiert.

Ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Expressionsstatus und der Rezidiv-Rate besteht, wird mittels des Chi^2-Tests untersucht.

2.5.3 Auswertung der Schnitte

Die Schnitte, die mit dem Antikörper für PD-L1 und PD-1 gefärbt sind, werden zum einen daraufhin untersucht, wie groß der Tumoranteil im Gesamtschnitt vor und nach der Chemotherapie ist, ob dieser positiv auf PD-L1 und PD-1 reagiert hat und wenn ja, wie viel Prozent des Tumors, anteilig des gesamten Tumors auf dem Schnitt, positiv angefärbt ist. Bei positiven Proben wird noch zusätzlich eine Färbeintensität von 1-3 bestimmt, wobei 1 die niedrigste und 3 die höchste Intensität darstellt.
Falls die Probe nach der Radiochemotherapie tumorfrei ist, wird diese mit NT (No Tumor) ausgewertet. Schnitte, bei denen keine Proben mehr vorhanden oder nicht auswertbar sind, z.B. durch Färbefehler oder Ablösen der Proben vom Objektträger, werden mit NA (Not applicable) ausgewertet.

Die PD-L1 und PD-1 Färbungen werden auch daraufhin untersucht, wie groß der Stroma-Anteil in den Schnitten vor und nach der Radiochemotherapie ist. Hierbei wird untersucht, welcher Anteil an positiven Immunzellen (Leukozyten, Plasmazellen, Makrophagen) innerhalb des Stromas auftritt. Dabei wird angegeben, wie groß der prozentuale Anteil des Stromas bzw. der darin enthaltenen Immunzellen im Schnitt ist und ob diese PD-L1 oder PD-1 positiv sind und, wenn dies der Fall ist, wie viel Prozent diese dann vom Stroma ausmachen. Bei positiven Proben wird noch eine Färbeintensität von 1-3 bestimmt, wobei 1 wiederum die niedrigste und 3 die höchste Intensität darstellt.
Die CD27 Färbungen werden auf den Immunzelleanteil untersucht, indem vier Einteilungsstufen gebildet werden.

1. 0 %-5 %
2. 6 %-30 %
3. 31 %-50 %
4. 51 % und mehr %

In der jeweiligen Stufe wird dann eine Färbeintensität von 1-3 bestimmt, wobei nach wie vor 1 die niedrigste und 3 die höchste Intensität darstellt.

CD27

Um die CD27 Expression beurteilen zu können, wird ein immunhistologischer Score genutzt. Der Score berechnet sich aus dem positiv angefärbten Anteil der

Immunzellen und der Färbeintensität.

Dazu werden die vier Stufen der prozentual angefärbten Immunzellen mit der dazugehörigen Intensität addiert:

Beispiel: 2 (6-30 %=Stufe 2)+2 (Intensität)=4 (Score)

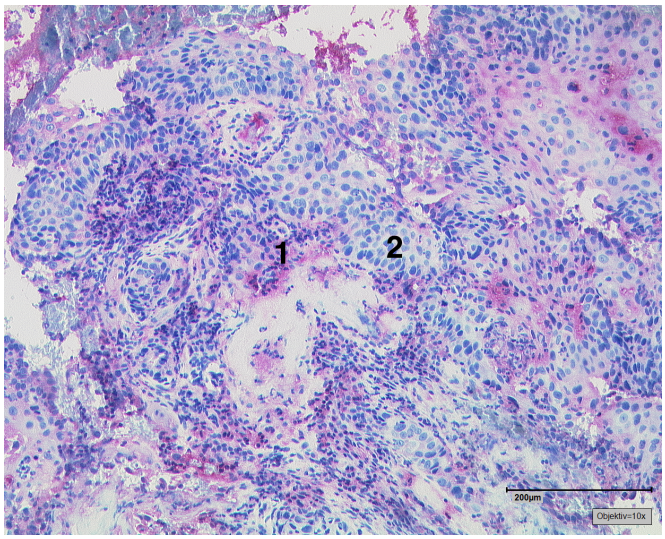

Abbildung 2 CD27 Intensität 1 (*1 Stroma *2Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, CD27 cluster of differentiation 27)

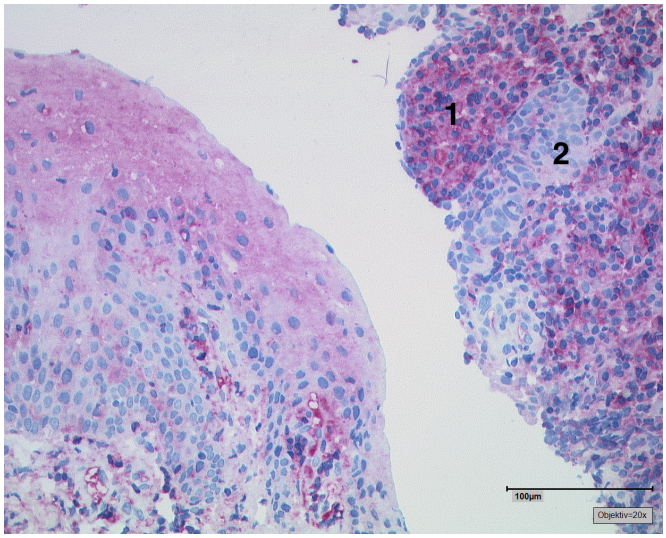

Abbildung 3 CD27 Intensität 2 (*1 Stroma *2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, CD27 cluster of differentiation 27)

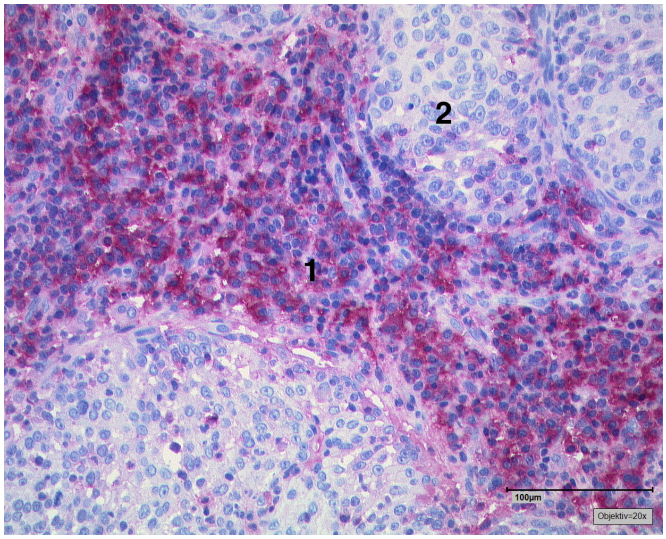

Abbildung 4 CD27 Intensität 3 (*1 Stroma *2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, CD27 cluster of differentiation 27), veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) (Doescher et al., 2020)

PD-L1

Um die PD-L1 Expression auf den Immunzellen des Stromas oder Tumorzellen zu analysieren, wird der H-Score genutzt. Dabei wird ein Produktwert aus dem Intensitätswert und dem prozentual angefärbten Immunzellen des Stromas oder dem Tumoranteil gebildet.

Beispiel: 30(Prozentualer Tumoranteil)x2(Intensität)=60(H-Score)

Tumor

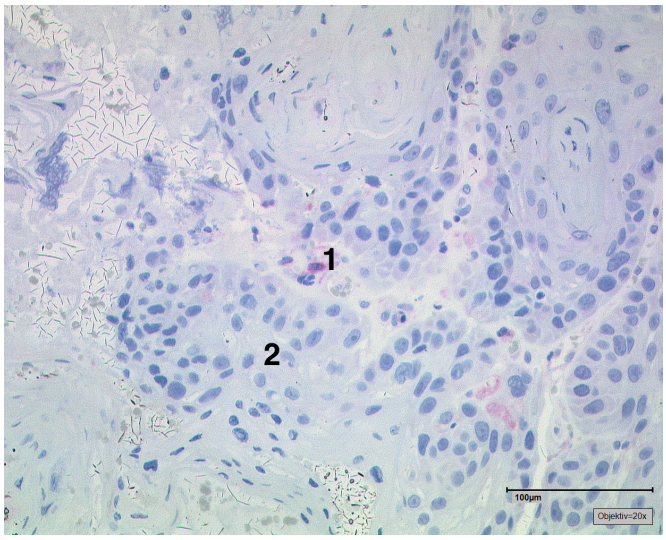

Abbildung 5 PD-L1 Tumor Intensität 0 (*1 Stroma *2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-L1 programmed cell death ligand 1)

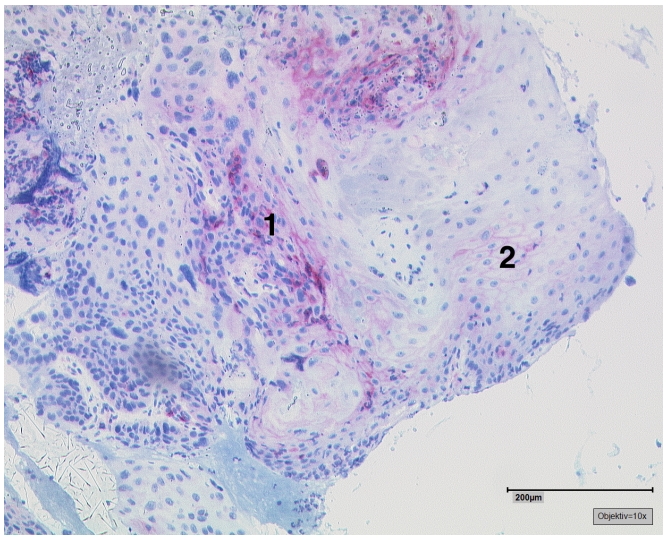

Abbildung 6 PD-L1 Tumor Intensität 1 (*1 Stroma *2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-L1 programmed cell death ligand 1)

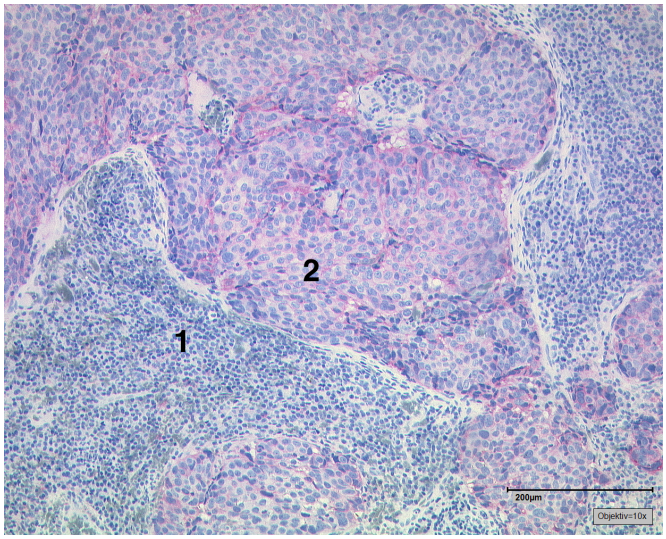

Abbildung 7 PD-L1 Tumor Intensität 2 (*1 Stroma *2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-L1 programmed cell death ligand 1), veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) (Doescher et al., 2020)

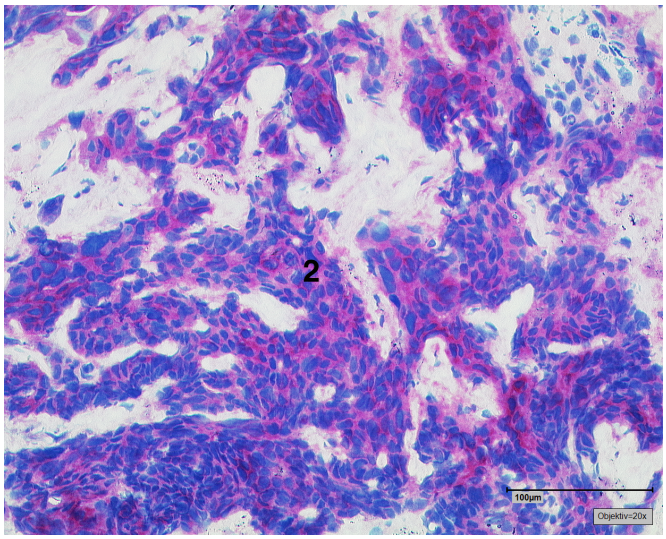

Abbildung 8 PD-L1 Tumor Intensität 3 (*2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-L1 programmed cell death ligand 1)

Stroma

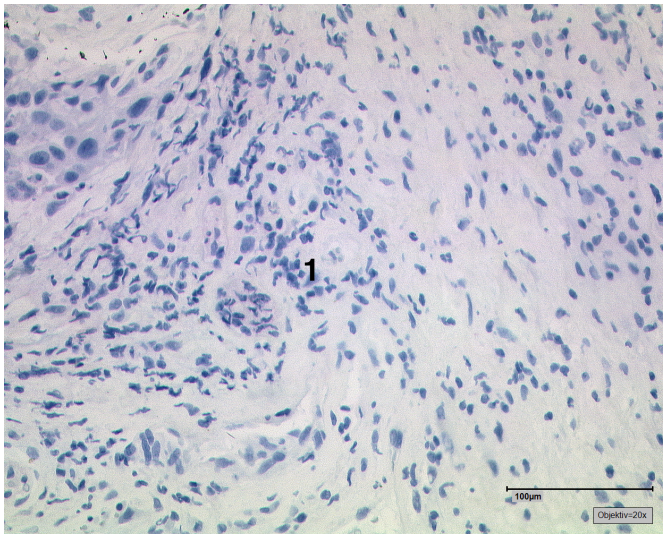

Abbildung 9 PD-L1 Stroma Intensität 0 (*1 Stroma), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-L1 programmed cell death ligand 1)

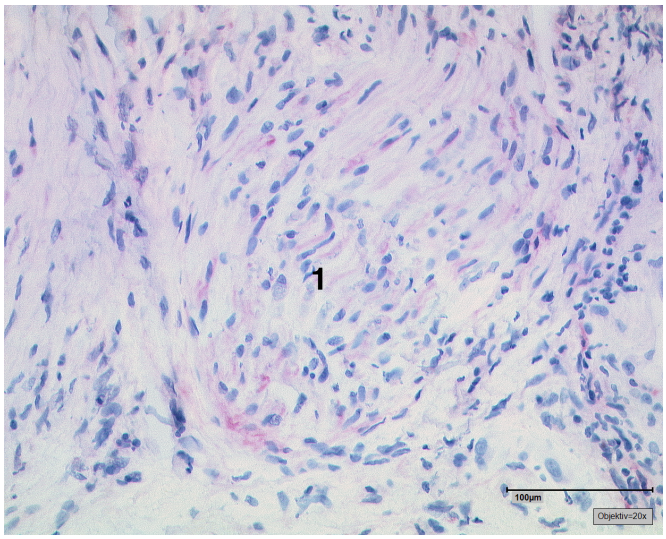

Abbildung 10 PD-L1 Stroma Intensität 1 (*1 Stroma), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-L1 programmed cell death ligand 1)

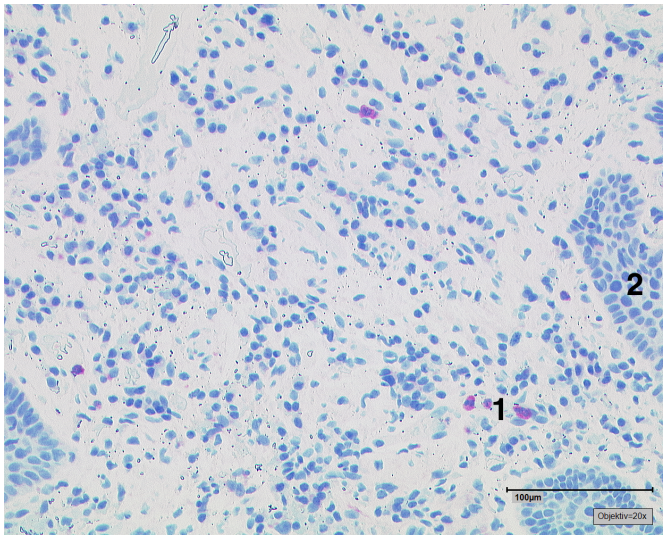

Abbildung 11 PD-L1 Stroma Intensität 2 (*1 Stroma *2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-L1 programmed cell death ligand 1)

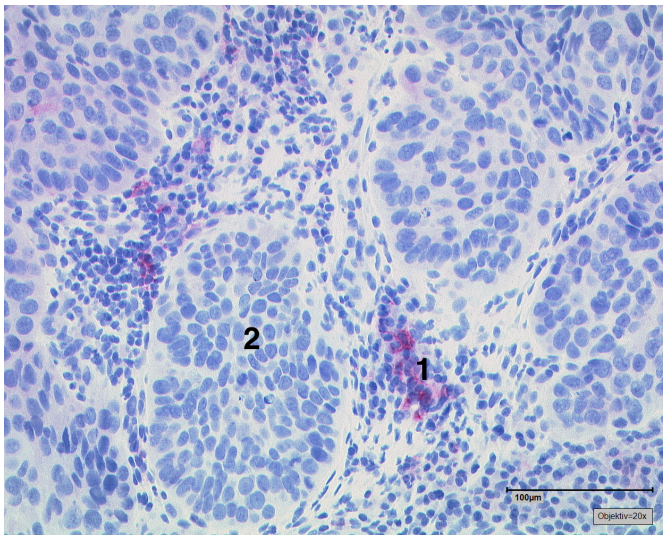

Abbildung 12 PD-L1 Stroma Intensität 3 (*1 Stroma *2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-L1 programmed cell death ligand 1), veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) (Doescher et al., 2020)

PD-1

Um die PD-1 Expression auf Immunzellen des Stromas oder Tumorzellen zu untersuchen, wird genau wie bei PD-L1 der H-Score zu Hilfe genommen.

Tumor

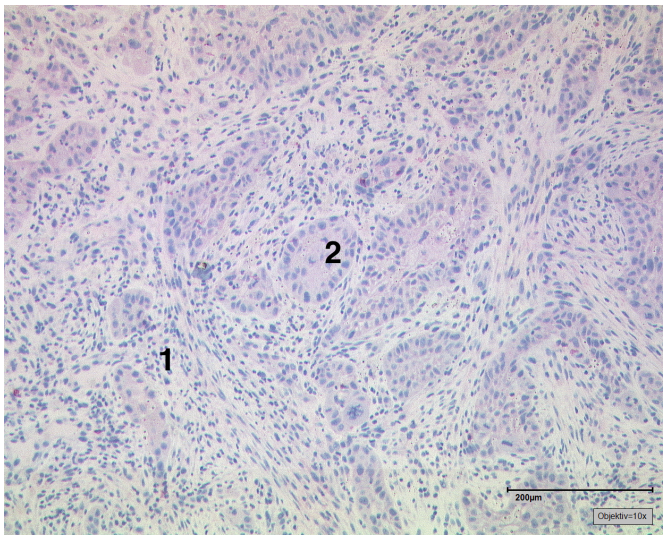

Abbildung 13 PD-1 Tumor Intensität 0 (*1 Stroma *2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-1 programmed cell death protein 1)

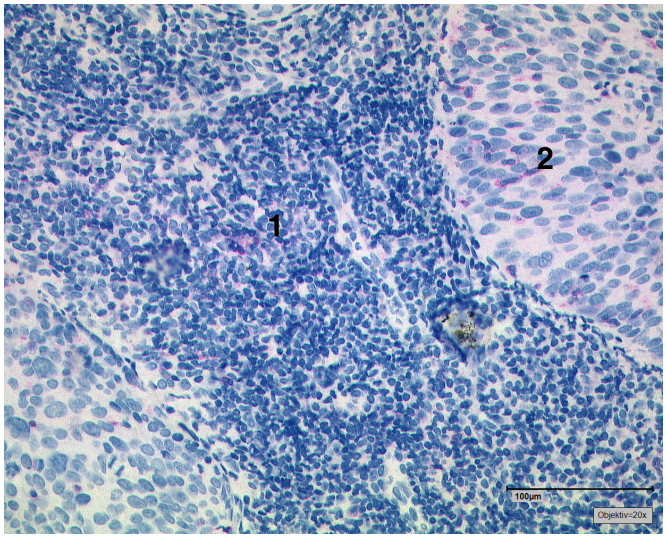

Abbildung 14 PD-1 Tumor Intensität 1 (*1 Stroma *2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-1 programmed cell death protein 1)

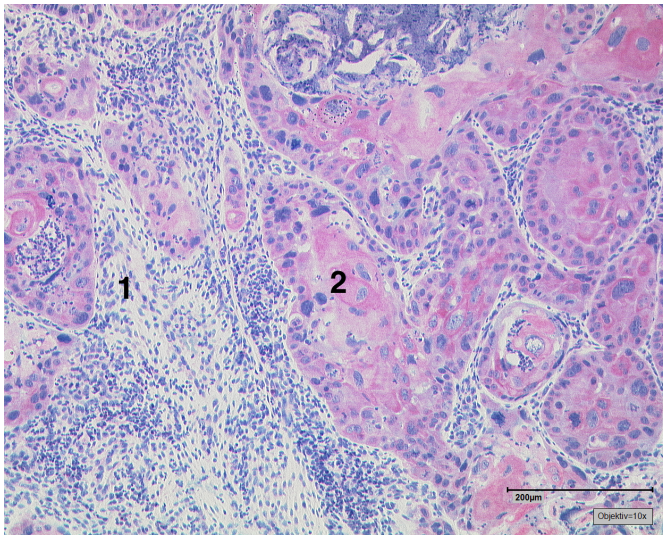

Abbildung 15 PD-1 Tumor Intensität 2 (*1 Stroma *2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-1 programmed cell death protein 1), veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) (Doescher et al., 2020)

Stroma

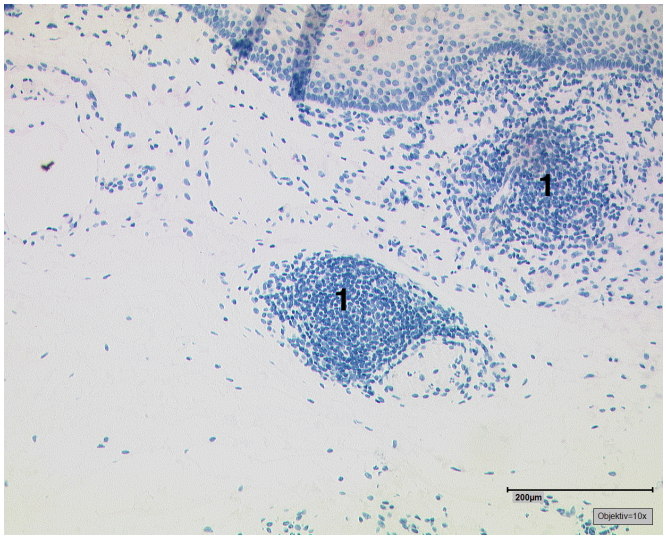

Abbildung 16 PD-1 Stroma Intensität 0 (*1 Stroma), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-1 programmed cell death protein 1)

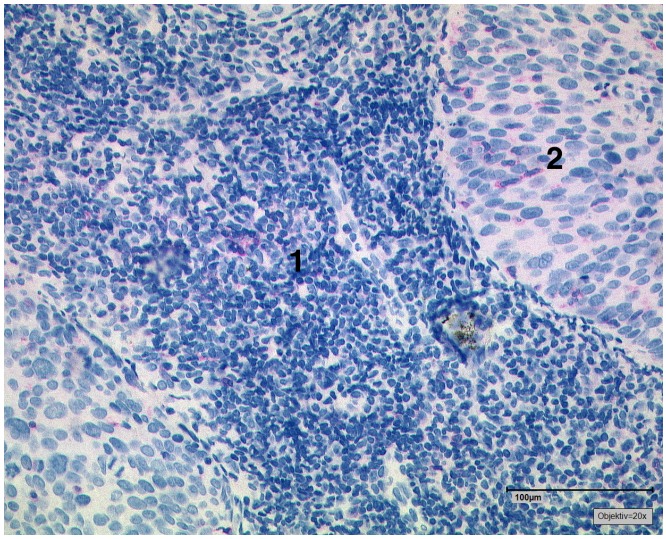

Abbildung 17 PD-1 Stroma Intensität 1 (*1 Stroma *2 Tumor), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-1 programmed cell death protein 1)

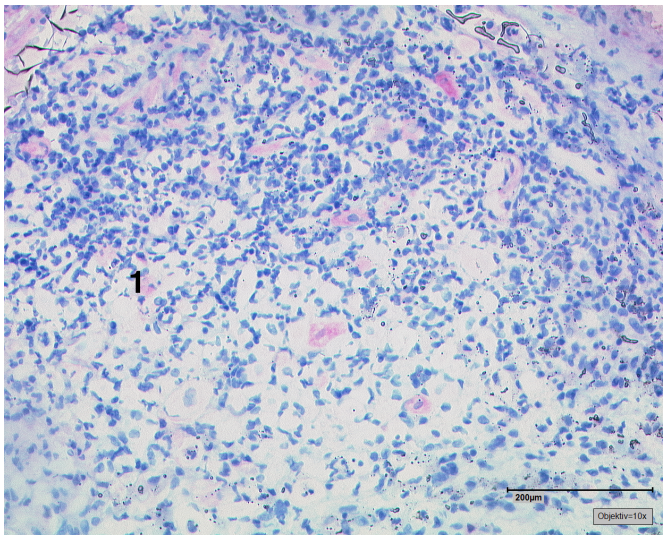

Abbildung 18 PD-1 Stroma Intensität 2 (*1 Stroma), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-1 programmed cell death protein 1)

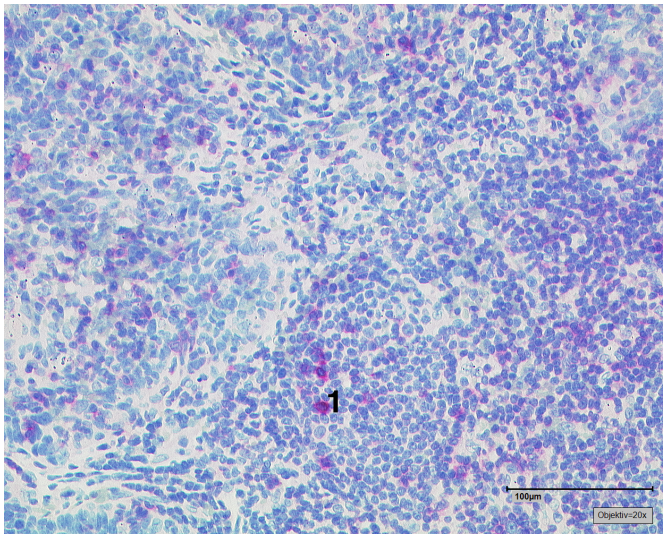

Abbildung 19 PD-1 Stroma Intensität 3 (*1 Stroma), (Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, PD-1 programmed cell death protein 1), veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) (Doescher et al., 2020)

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

Die Patientenkohorte setzt sich aus 67 Patienten zusammen, die die Erstdiagnose eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum zwischen Mai 2005 und März 2016 gestellt bekommen hatten.

Das mediane Alter bei Diagnosestellung betrug 61 Jahre bei einem medianen Follow-up von 26 Monaten ab Diagnosestellung und einer 5-Jahresüberlebensrate von 75,1 %. Die Anzahl der Oropharynx-Karzinome in der Patientenkohorte lag bei 36 (53,7 %), die der Hypopharynx-Karzinome bei 18 (26,9 %), die der Larynx-Karzinome bei 9 (13,4 %) und die der Mundhöhlen-Karzinome bei 4 (6 %) Patienten. Das klinische Tumor-Stadium betrug bei 55 (82,1 %) Patienten cT3 oder höher mit einem positiven Lymphknotenbefall in 54 (80,7 %) Fällen. 66 (98,5 %) Patienten hatten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose keine Fernmetastasen.

Alle Patienten erhielten eine Radiochemotherapie, bei der eine durchschnittliche Bestrahlungsdosis von 67,66 Gy appliziert wurde. 59 (88 %) Patienten erhielten eine konkomitante Chemotherapie mit Cisplatin oder Carboplatin, die verbleibenden 8 (12 %) Patienten erhielten entweder Mitomycin C mit oder ohne 5-FU oder Cetuximab.

Bei Re-Biopsien im Rahmen einer Kontroll-Endoskopie nach der Radiochemotherapie wurden bei 19 (28,4 %) Patienten vitale Tumorzellen nachgewiesen. Diese Patienten hatten somit kein vollständiges Ansprechen auf die pRCT und gingen in der Auswertung als Therapieversager ein.

Die Patientencharakterisierung ist in Tabelle 7 genau aufgeschlüsselt.

Tabelle 7: Charakterisierung der Patientenkohorte, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016

(HPV Humanen Papillomavirus, cT klinisches Tumor-Stadium, cN klinischer Lymphknotenbefall, cM klinische Fernmetastasen, 5-FU 5-Fluorouracil, RCT Radiochemotherapie, Gy Gray), veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) (Doescher et al., 2020)

Charakteristika	Patienten
Patienten	67
Alter bei Diagnose	
Median	61 Jahre
Range	41-81 Jahre
5-Jahres Überleben	75,1 %
Geschlecht	
weiblich	18 (26,9 %)
männlich	49 (73,1 %)
Medianes Follow-up	26 Monate (Mittelwert 31,01 Monate)
Lokalisation	
Oropharynx	36 (53,7 %)
HPV positiv	6 (16,7 %)
HPV negativ	8 (22,2 %)
HPV Status fehlt	22 (61,1 %)
Hypopharynx	18 (26,9 %)
Larynx	9 (13,4 %)
Mundhöhle	4 (6 %)
cT-Stadium	
cT1	4 (6 %)
cT2	8 (11,9 %)
cT3	18 (26,9 %)
cT4a	29 (43,3 %)
cT4b	8 (11,9 %)
cN	
cN0	13 (19,4 %)
cN1	4 (6 %)
cN2a	4 (6 %)
cN2b	17 (25,4 %)
cN2c	26 (38,8 %)
cN3	3 (4,5 %)
cM	
cM0	66 (98,5 %)
cM1	1 (1,5 %)
Grading	
G I	3 (4,5 %)
G II	45 (67,2 %)
G III	19 (28,4 %)
Radiotherapie (Gy)	
Mittelwert	67.66 Gy
Chemotherapeutikum	
Cisplatin	49 (73,1 %)
20mg/m^2 d1-5, w1+5	32 (47,8 %)
40mg/m^2 wöchentlich	8 (11,9 %)
20mg/m^2 + 5-FU 600mg/m^2	2 (3 %)
missing	7 (10,4 %)
Carboplatin	10 (14,9 %)
AUC-6	10 (14,9 %)
Mitomycin	6 (9 %)
10mg/ m^2 w1+5	4 (6 %)
+ 5-FU	2 (3 %)
Cetuximab	2 (3 %)
250mg/m^2	1 (1,5 %)
missing	1 (1,5 %)
Zeitraum der Erstdiagnose	Mai 2005 – März 2016
Biopsie nach RCT	
Negativ	48 (71,6 %)
Positiv	19 (28,4 %)

3.2 Expressionsstatus

Biopsien, die nach der RCT noch Tumorgewebe enthalten, werden als Therapieversager gesehen.
Patienten, deren Biopsie nach der RCT tumorfrei ist, gelten als Therapieansprecher.

3.2.1 PD-L1 Expressionsstatus Zellen des Tumorstromas

Die PD-L1 Expression wird vor und nach RCT mit Hilfe des H-Scores und mit einem gepaarten T-Test analysiert und in Tabelle 8 aufgeführt.
Der gepaarte T-Test zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der PD-L1 Expression auf den Immunzellen innerhalb des Stromas vor und nach RCT gibt (p=0,612).

Der unabhängige T-Test, ebenfalls in Tabelle 8 dargestellt, zeigt, dass es einen statistischen Unterschied zwischen Therapieansprechern und Therapieversagern hinsichtlich ihrer PD-L1 Expression vor RCT auf den Immunzellen des Stromas gibt, (p=0,008).
Dabei haben Patienten, die an einem posttherapeutischen Tumorresiduum leiden, vor der RCT einen mittleren H-Score von 1,61. Patienten, die posttherapeutisch tumorfrei waren, weisen einen mittleren H-Score von 3,62 auf.

3.2.2 PD-L1 Expressionsstatus auf Tumorzellen

Bei der Tumorzellen-Analyse hinsichtlich der PD-L1 Expression wird ein gepaarter und ein ungepaarter T-Test durchgeführt.
Der gepaarte T-Test zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der PD-L1 Expression vor und nach der RCT auf Tumorzellen gibt, (p=0,178).

Genauso zeigt der unabhängige T-Test, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der PD-L1 Expression und dem Ansprechen der Patienten auf die RCT gibt, (p=0,129; nach RCT p=/).

3.2.3 PD-1 Expressionsstatus auf Zellen des Tumorstromas

Um die PD-1 Expression auf Tumorzellen zu untersuchen, wird genau wie bei PD-L1 der H-Score zu Hilfe genommen und ein gepaarter T-Test durchgeführt.
Der T-Test zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der PD-1 Expression vor und nach RCT auf den Immunzellen des Stromas gibt, (p=0,155).

Der ungepaarte T-Test zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Expressionsstatus der Immunzellen des Stromas vor und nach RCT von Therapieansprechern oder Therapieversagern (vor RCT p=0,316; nach RCT p=0,451).

3.2.4 PD-1 Expressionsstatus auf Tumorzellen

Um die PD-1 Expression auf Tumorzellen zu untersuchen, werden genau wie bei den Immunzellen des Stromas ein gepaarter und ein unabhängiger T-Test verwendet.
Der gepaarte T-Test zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der PD-1 Expression vor und nach RCT auf Tumorzellen gibt, (p=0,412).

Der unabhängige T-Test zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen Therapieansprechern und Therapieversagern hinsichtlich der PD-1 Expression vor und nach RCT gibt (vor RCT p=0,309; nach RCT p=/).

3.2.5 CD27 Expressionsstatus auf Immunzellen im Stroma

Um die CD27 Expression beurteilen zu können, wird der immunhistologische Score genutzt. Die errechneten Werte für CD27 vor und nach Radiochemotherapie können so mittels gepaartem T-Test analysiert werden.
Der CD27 Expressionsstatus der Immunzellen im Stroma ist demnach signifikant niedriger nach Radiochemotherapie, (p=0,019 Mittelwerte 4,16 vs. 3,75).

Der ungepaarte T-Test zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Therapieansprechern und Therapieversagern hinsichtlich ihrer CD27 Expression vor und nach der RCT gibt, (vor RCT p=0,563; nach RCT p=0,149).

Tabelle 8: gepaarter T-Test (Expressionsstatus PD-L1, PD-1, CD27 vor u. nach RCT)
ungepaarter T-Test (Expressionsstatus von PD-L1, PD-1, CD27 bezgl. Therapieansprecher Biopsie negativ/positiv), Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016

(RCT Radiochemotherapie, CD27 cluster of differentiation 27, PD-1 programmed cell death protein 1, PD-L1 programmed cell death ligand 1)

	Signifikanz (2-seitig) gepaarter Test	**Signifikanz (2-seitig) ungepaarter Test**	
		vor RCT	nach RCT
PD-L1 Immunzellen Stroma	p=0,612	p=0,008	p=0,883
PD-1 Immunzellen Stroma	p=0,155	p=0,316	p=0,451
CD27 Immunzellen Stroma	p=0,019	p=0,563	p=0,149
PD-L1 Tumorzellen	p=0,178	p=0,129	p=/
PD-1 Tumorzellen	p=0,412.	p=0,309	p=/

3.2.6 Betrachtung des Expressionsstatus vor und nach RCT stratifiziert nach Ansprechen

Der gepaarte T-Test unter Berücksichtigung der Stratifikation hinsichtlich Therapieansprecher und Therapieversager zeigt, dass es einen signifikanten Unterschied der CD27 Expression innerhalb der Therapieversager vor und nach RCT gibt (Tab. 9). Dabei exprimieren Immunzellen von Therapieversagern nach RCT signifikant weniger CD27 (Score 4 vs. 3,39; p=0,037).

Tabelle 9: Expressionsstatus vor und nach Radiochemotherapie stratifiziert nach Therapieansprechen, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016

(CD27 cluster of differentiation 27, PD-1 programmed cell death protein 1, PD-L1 programmed cell death ligand 1, prä prätherapeutisch, post posttherapeutisch)

Gepaarter T-Test bei stratifizierten Daten	**complete response**		**partial response**	
	p	Mittelwerte	p	Mittelwerte
CD27 Immunzellen Stroma	0,129	Prä 4,22 Post 3,88	0,037	Prä 4,00 Post 3,39
PD-L1 Tumorzellen	/	/	0,178	Prä 18,24 Post 49,65
PD-L1 Immunzellen Stroma	0,290	Prä 2,70 Post 2,00	0,513	Prä 1,61 Post 2,22
PD-1 Tumorzellen	/	/	0,412	Prä 5,93 Post 2,21
PD-1 Immunzellen Stroma	0,108	Prä 3,80 Post 2,12	1,0	Prä 2,53 Post 2,53

3.3 Expressionsveränderungen durch Art des Chemotherapeutikums

Durch das teilweise veränderte Expressionsmuster vor und nach der Radiochemotherapie wird die Frage aufgeworfen, wovon diese Veränderungen abhängen können. Bei dieser Überlegung wird die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise die Art des Chemotherapeutikums eine Rolle spielen könnte.

Mittels Kruskal-Wallis-Test, in Tabelle 10 aufgeführt, zeigt sich jedoch, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Expressionsstatus auf Stroma- oder Tumorzellen und der Art des Chemotherapeutikums besteht.

Tabelle 10: Kruskal-Wallis-Test Einfluss Therapeutika auf Expression, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016

(CD27 cluster of differentiation 27, PD-1 programmed cell death protein 1, PD-L1 programmed cell death ligand 1, prä prätherapeutisch, post posttherapeutisch, N Anzahl der behandelten Patienten**)**

		Score Mittelwerte			
Kruskal-Wallis-Test	p-Werte	Cisplatin N=49	Carboplatin N=10	Mitomycin N=6	Cetuximab N=2
CD27 prä CD27 post	0,808	31,67 33,99	42,30 36,80	20,75 33,25	54,50 22,50
PD-L1 Tumor prä PD-L1 Tumor post	0,275	31,48 10,41	37,72 3,50	32,00 11,67	34,50 7,25
PD-L1 Stroma prä PD-L1 Stroma post	,081	32,90 29,91	32,11 17,13	26,08 36,75	28,50 34,50
PD-1 Tumor prä PD-1 Tumor post	0,353	28,70 6,75	37,89 9,50	33,00 6,00	44,50 10,00
PD-1 Stroma prä PD-1 Stroma post	0,981	31,42 29,62	36,75 30,44	36,00 32,50	25,50 29,00

3.4 Expressionsstatus und Gesamtüberleben

CD27

Um den Einfluss von CD27 auf das Gesamtüberleben der Patienten zu beurteilen, wird zunächst ein Cut-off von 5 Punkten für CD27 positive Karzinome festgelegt.
In der Kaplan-Meier-Analyse kann mittels Log-Rank-Test ein signifikanter Vorteil im Gesamtüberleben für Patienten mit CD27 positiven Immunzellen festgestellt werden (95,8 % vs. 58,1 % 5-Jahres Überleben, p=0,042). (Abb. 20)

PD-L1

Um die Auswirkungen der PD-L1 Expression auf das Überleben der Patienten zu untersuchen, wird der Cut-Off bei ≥ 1 für PD-L1 positive Fälle festgelegt.

Stroma

Die Kaplan-Meier Analyse zeigt anhand des Log-Rank-Tests keinen signifikanten Einfluss der PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stroma hinsichtlich des Gesamtüberlebens der Patienten, (p=0,498). (Abb.21)

Tumor

Auch bei der Berechnung des Log-Rank-Tests für die Tumorzellen hinsichtlich der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der PD-L1 Expression gibt es keinen

signifikanten Einfluss der PD-L1 Expression auf die Überlebenszeit, (p=0,686). (Abb. 22)

PD-1

Um die Auswirkungen der PD-1 Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten zu untersuchen, wird der Cut-Off bei ≥ 1 für PD-1 positive Fälle festgelegt.

Stroma

Die Kaplan-Meier Analyse zeigt anhand des Log-Rank-Tests keinen signifikanten Einfluss der PD-1 Expression auf den Immunzellen des Stromas auf das Gesamtüberleben der Patienten, (p=0,685). (Abb. 23)

Tumor

Genauso gibt es keinen signifikanten Einfluss der PD-1 Expression auf Tumorzellen auf die Gesamtüberlebenszeit, (p=0,664). (Abb. 24)

Das 5-Jahres-Überleben ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: 5-Jahres-Überleben hinsichtlich des Expressionsstatus, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016

(CD27 cluster of differentiation 27, PD-1 programmed cell death protein 1, PD-L1 programmed cell death ligand 1, prä prätherapeutisch, post posttherapeutisch, sig Signifikanz)

		5-Jahres-Überleben	**Log Rank sig.**
CD27 Immunzellen Stroma	2-4	58,1 %	0,042
	5-7	95,8 %	
PD-L1 Immunzellen Stroma	negativ	60 %	0,498
	positiv	77,8 %	
PD-L1 Tumorzellen	negativ	80,3 %	0,686
	positiv	69,6 %	
PD-1 Immunzellen Stroma	negativ	74,3 %	0,685
	positiv	74,0 %	
PD-1 Tumorzellen	negativ	73,5 %	0,664
	positiv	75 %	

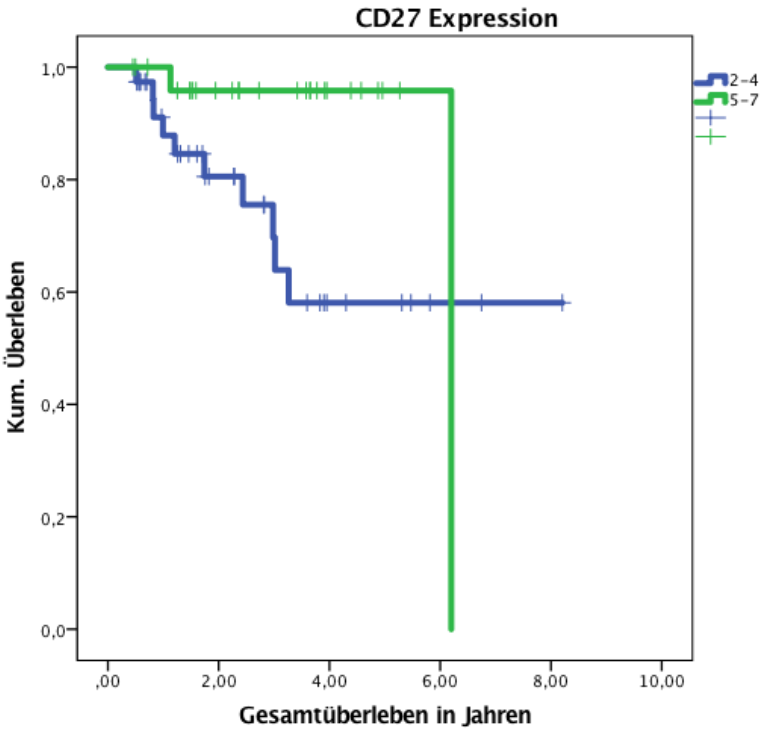

Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der CD27 Expression auf Immunzellen des Stromas bzgl. des Gesamtüberlebens, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016 (CD27 cluster of differentiation), veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) **(**Doescher et al., 2020)

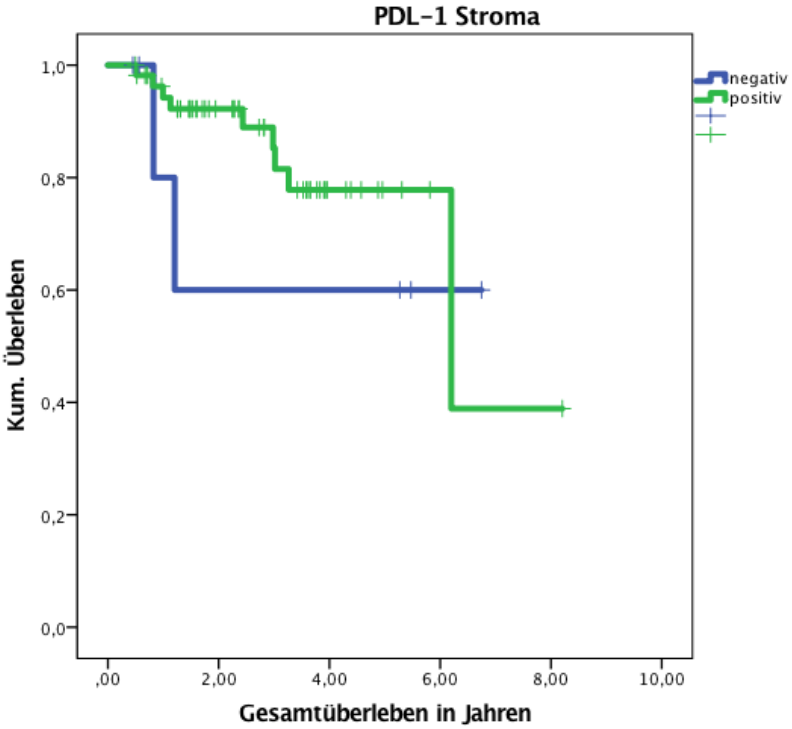

Abbildung 21 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas bzgl. des Gesamtüberlebens, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-L1 programmed cell death ligand 1)

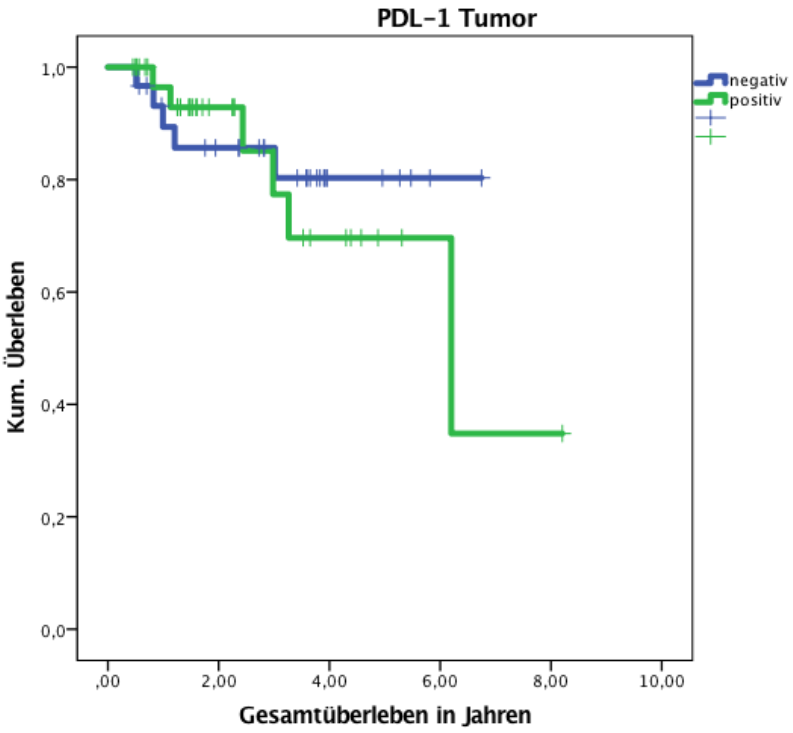

Abbildung 22 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-L1 Expression auf Tumorzellen bzgl. des Gesamtüberlebens, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-L1 programmed cell death ligand 1)

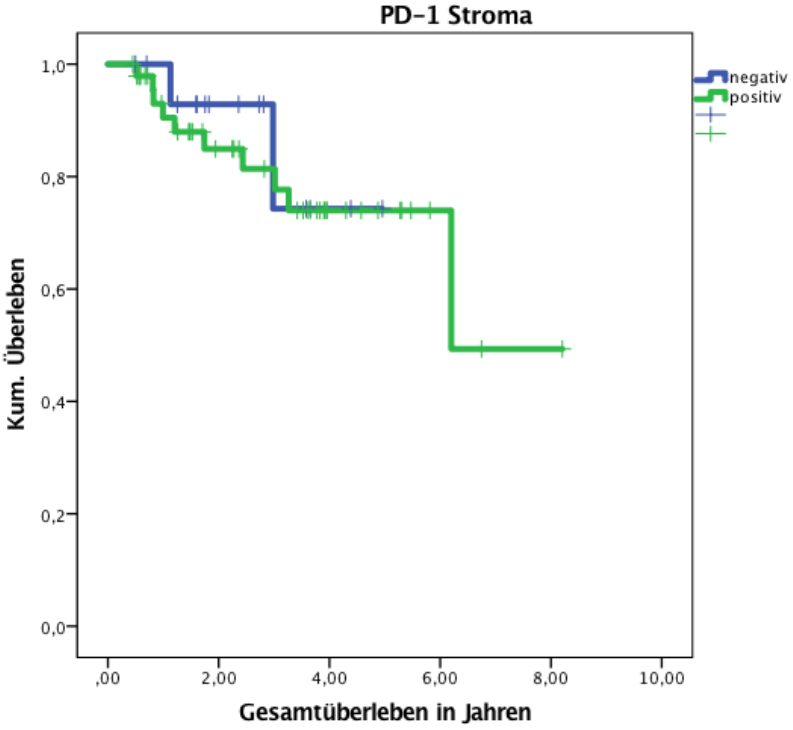

Abbildung 23 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-1 Expression auf Immunzellen des Stromas bzgl. des Gesamtüberlebens, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-1 programmed cell death protein 1)

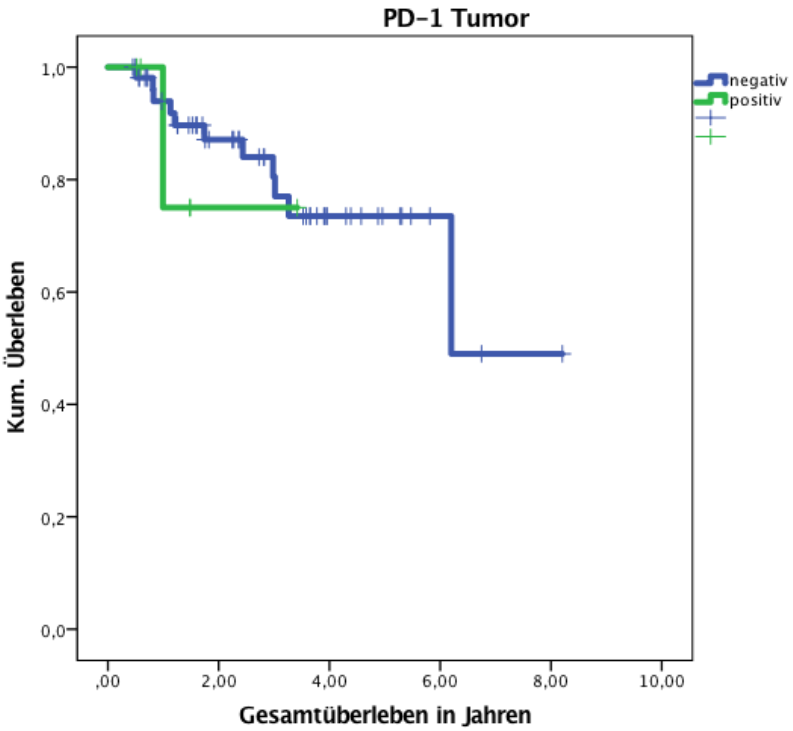

Abbildung 24 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-1 Expression auf Tumorzellen bzgl. des Gesamtüberlebens, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-1 programmed cell death protein 1)

3.5 Expressionsstatus und Rezidiv-Rate

Um die Rezidiv-Rate zu untersuchen, wird der gleiche Cut-off gewählt wie in der Lebenszeitanalyse und mittels Chi^2-Test verglichen. Die Werte dafür sind in Tabelle 12 dargestellt.

CD27

Anhand des Chi^2-Tests ist zu sehen, dass es keinen signifikanten Zusammenhang sowohl vor als auch nach RCT zwischen der CD27 Expression auf Immunzellen des Stromas und einem Rezidiv gibt (vor RCT p=0.981, nach RCT p=0,745).

PD-L1

<u>Stroma</u>

Zwischen der PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas vor und nach RCT besteht kein signifikanter Zusammenhang zu einem Rezidiv (vor RCT p=0,858 nach RCT p=0,640).

Tumor

Die PD-L1 Expression auf Tumorzellen vor der RCT zeigt, dass es eine signifikante Korrelation mit dem Auftreten eines Rezidivs gibt, nach der RCT ist dies nicht der Fall (vor RCT p=0,013, nach RCT p=0,180). Vor RCT sind 30 Patienten PD-L1 negativ, von denen 19 rezidivfrei sind und 11 ein Rezidiv (36.6%) entwickelt haben. Für die PD-L1 positiven Fälle wird der Cut-Off bei ≥ 1 festgelegt, somit sind 34 Patienten PD-L1 positiv, von denen 11 rezidivfrei sind und 23 ein Rezidiv (67.6%) entwickelt haben.

PD-1

Stroma und Tumor

Die PD-1 Expression vor und nach RCT auf Immunzellen des Stromas oder Tumorzellen zeigt keinen signifikanten Zusammenhang zur Entwicklung eines Rezidivs (Tab. 12).

Tabelle 12: Chi^2-Test Rezidiv in Verbindung mit der Expression, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016

(CD27 cluster of differentiation 27, PD-1 programmed cell death protein 1, PD-L1 programmed cell death ligand 1, prä prätherapeutisch, post posttherapeutisch)

	Chi^2 nach Pearson p-Werte
CD27 Immunzellen Stroma prä	0,981
CD27 Immunzellen Stroma post	0,745
PD-L1 Tumorzellen prä	**0,013**
PD-L1 Tumorzellen post	0,180
PD-L1 Immunzellen Stroma prä	0,858
PD-L1 Immunzellen Stroma post	0,640
PD-1 Tumorzellen prä	0,152
PD-1 Tumorzellen post	0,435
PD-1 Immunzellen Stroma prä	0,111
PD-1 Immunzellen Stroma post	0,124

3.6 Expressionsstatus und krankheitsfreies Überleben

Um das krankheitsfreie Überleben zu analysieren, werden die gleichen Cut-Offs wie schon in der Überlebenszeitanalyse gewählt (Tab. 13).

CD27

Eine Kaplan-Meier-Analyse mittels Log-Rank-Test kann keinen signifikanten Vorteil zwischen krankheitsfreiem Überleben und der CD27 Expression feststellen (vor RCT p= 0,545, nach RCT p=0,894), (Abb. 25 u. 26).

PD-L1 Tumor

Eine Kaplan-Meier-Analyse mittels Log-Rank-Test kann einen signifikanten Vorteil im krankheitsfreien Überleben feststellen. Für Patienten mit einem negativen PD-L1 Score-Wert auf Tumorzellen vor der RCT ist das krankheitsfreie Überleben signifikant erhöht, (p=0,007). (Abb. 27)

Patienten mit einem negativen Score-Wert leben durchschnittlich 4,65 Jahre rezidivfrei, wo hingegen Patienten mit einem positiven Score-Wert 2,82 Jahre rezidivfrei bleiben.

Die Proben nach der RCT Behandlung zeigen keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen der Expression von PD-L1 auf Tumorzellen und dem krankheitsfreien Überleben, (p=0,201). (Abb. 28)

PD-L1 Stroma

Eine Kaplan-Meier-Analyse mittels Log-Rank-Test kann keinen signifikanten Vorteil im krankheitsfreien Überleben und der PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas feststellen (vor RCT p=0,695, nach RCT p=0,198). (Abb. 29 u. 30)

PD-1 Tumor

Eine Kaplan-Meier-Analyse mittels Log-Rank-Test kann einen signifikanten Vorteil im krankheitsfreien Überleben feststellen. Für Patienten mit einem negativen PD-1 Score-Wert auf Tumorzellen vor RCT ist das krankheitsfreie Überleben signifikant verlängert (p=0,031 negativer Score Wert 4,15 Jahre, positiver Score-Wert 1,20 Jahre). (Abb. 31)

Nach RCT lässt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der PD-1 Expression und dem krankheitsfreien Überleben feststellen, (p=0,916). (Abb. 32)

PD-1 Stroma

Eine Kaplan-Meier-Analyse mittels Log-Rank-Test kann keinen signifikanten Vorteil im krankheitsfreien Überleben und der PD-1 Expression auf Immunzellen des Stromas feststellen (vor RCT p=0,315, nach RCT p=0,086). (Abb. 33 u. 34)

Tabelle 13: Krankheitsfreies Überleben Log-Rank (positiver Cut-Off für CD27 ≥ 5, positiver Cut-Off für PD-L1 und PD-1 ≥ 1), Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016

(CD27 cluster of differentiation 27, PD-1 programmed cell death protein 1, PD-L1 programmed cell death ligand 1, prä prätherapeutisch, post posttherapeutisch)

	Krankheitsfreies Überleben Log Rank p-Werte	**Mittelwerte in Jahren**	
Cut-Off		Negativ	Positiv
CD27 Immunzellen Stroma prä	0,545	3,89	3,08
CD27 Immunzellen Stroma post	0,894	4,05	2,68
PD-L1 Tumorzellen prä	**0,007**	4,65	2,82
PD-L1 Tumorzellen post	0,201	0,73	1,56
PD-L1 Immunzellen Stroma prä	0,695	3,22	4,03
PD-L1 Immunzellen Stroma post	0,198	2,11	3,81
PD-1 Tumorzellen prä	**0,031**	4,15	1,20
PD-1 Tumorzellen post	0,916	1,71	0,95
PD-1 Immunzellen Stroma prä	0,315	3,31	3,75
PD-1 Immunzellen Stroma post	0,086	4,84	2,71

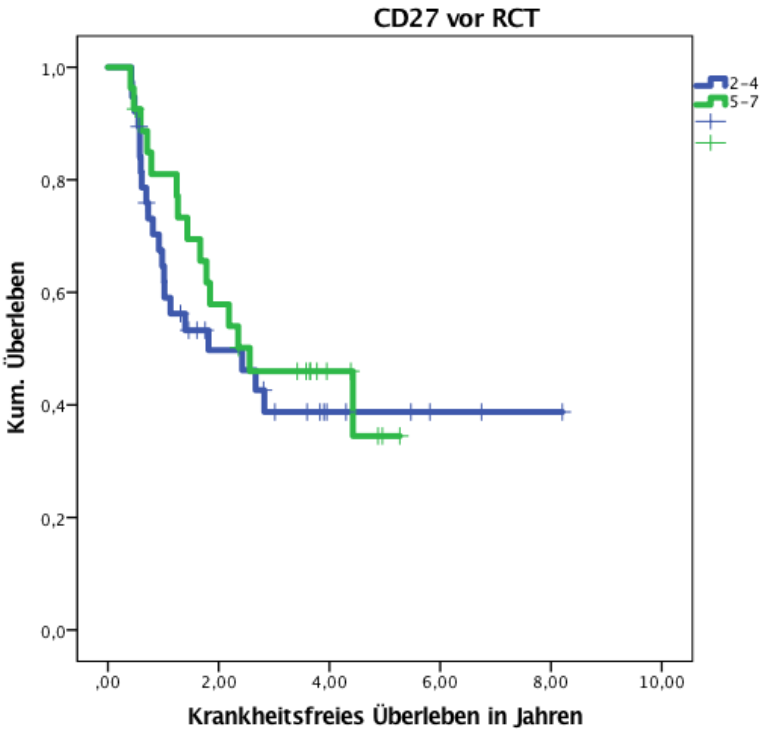

Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der CD27 Expression auf Immunzellen des Stromas bzgl. des krankheitsfreien Überlebens vor Radiochemotherapie, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (CD27 cluster of differentiation 27)

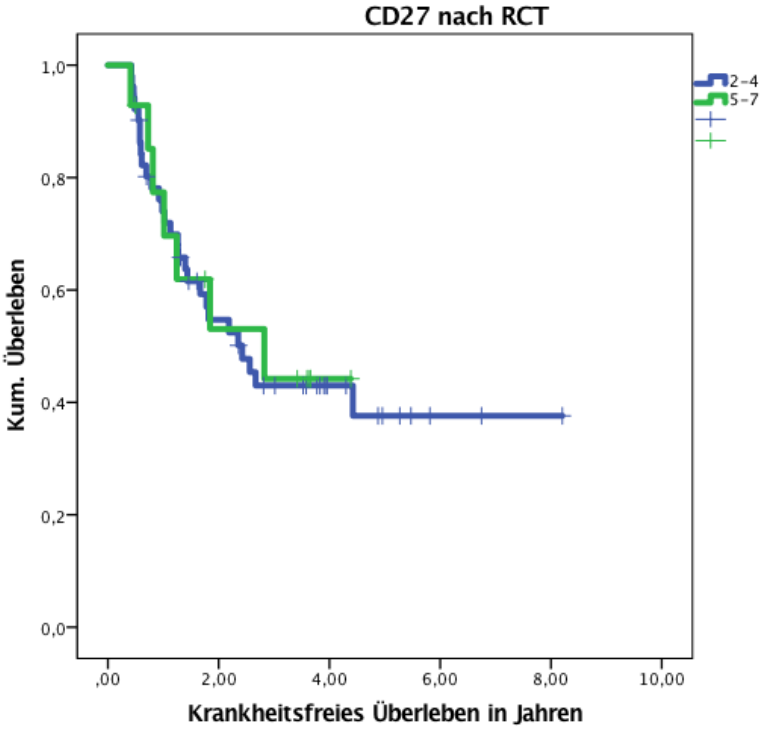

Abbildung 26 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der CD27 Expression auf Immunzellen des Stromas bzgl. des krankheitsfreien Überlebens nach Radiochemotherapie, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (CD27 cluster of differentiation 27)

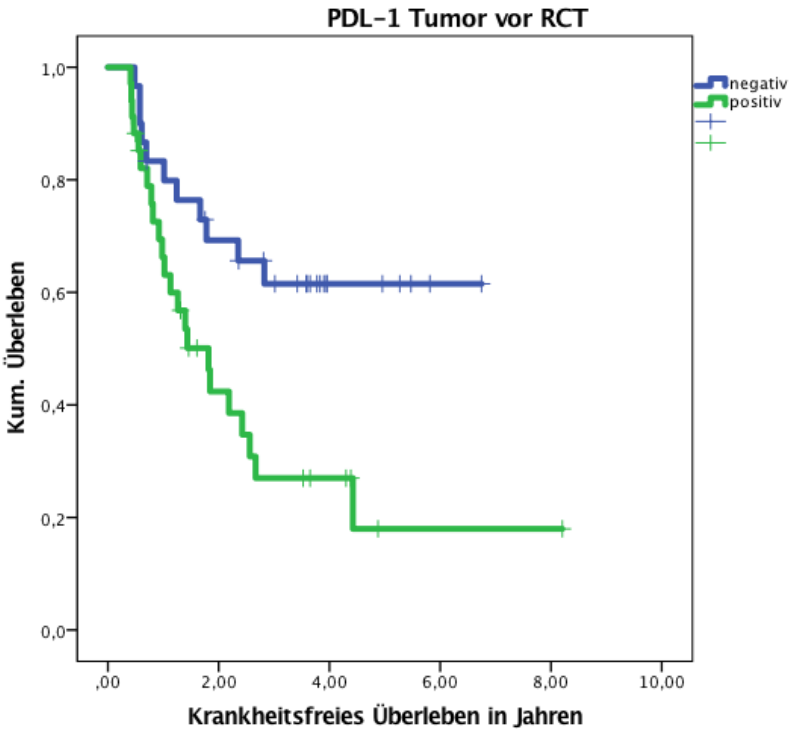

Abbildung 27 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-L1 Expression auf Tumorzellen bzgl. des krankheitsfreien Überlebens vor Radiochemotherapie, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-L1 programmed cell death ligand 1), veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) (Doescher et al., 2020)

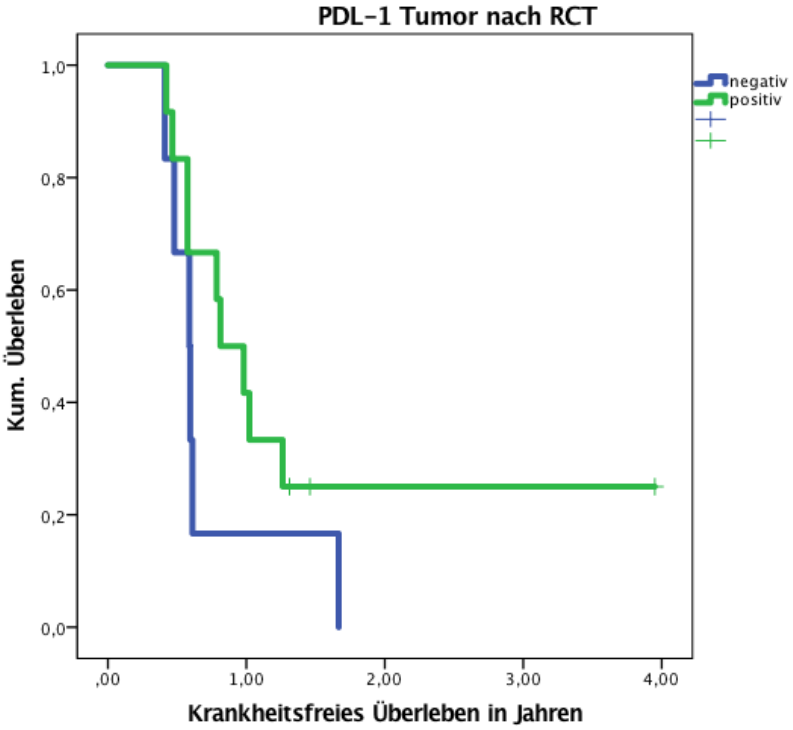

Abbildung 28 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-L1 Expression auf Tumorzellen bzgl. des krankheitsfreien Überlebens nach Radiochemotherapie, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-L1 programmed cell death ligand 1)

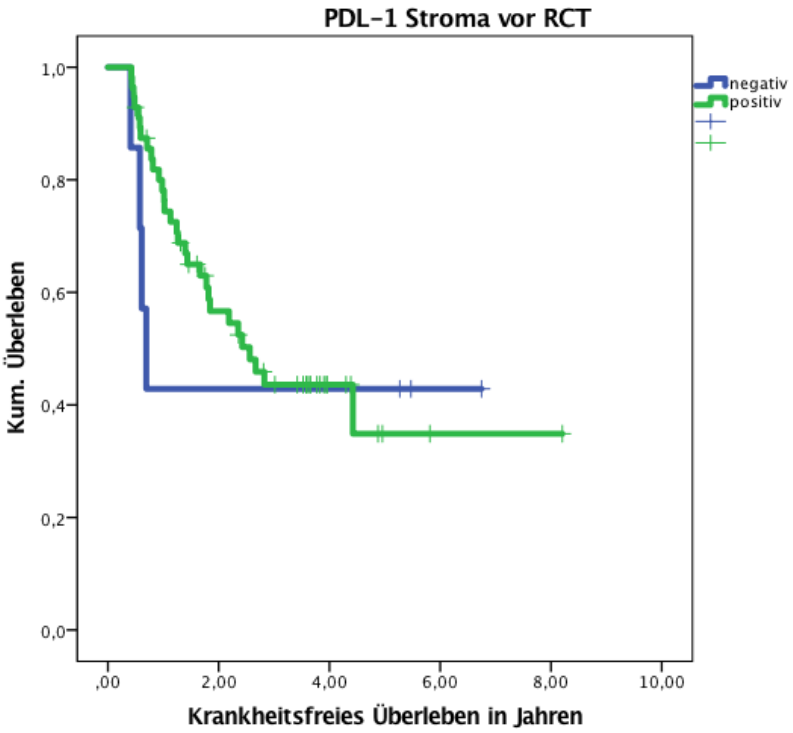

Abbildung 29 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas bzgl. des krankheitsfreien Überlebens vor Radiochemotherapie, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-L1 programmed cell death ligand 1)

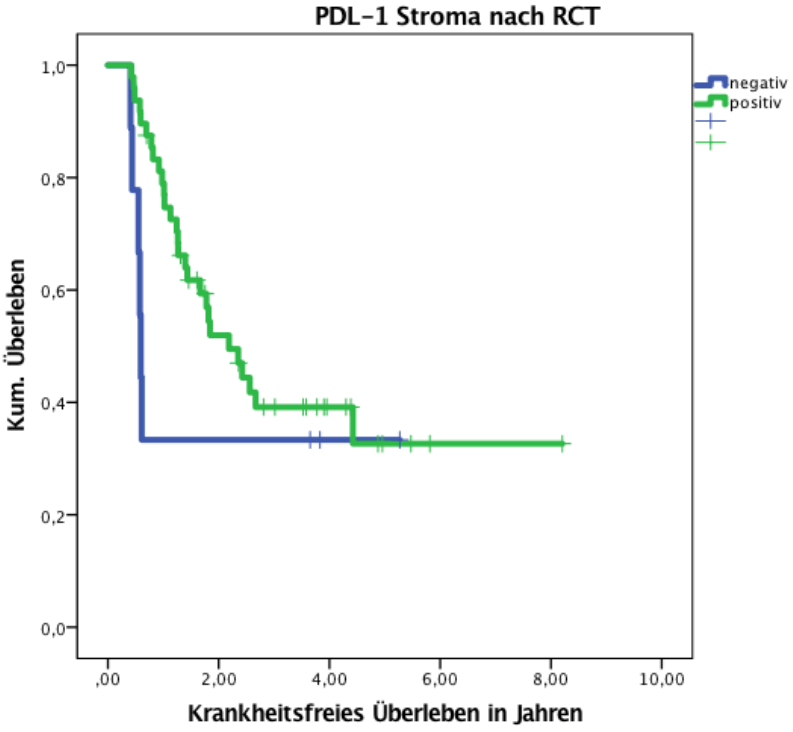

Abbildung 30 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas bzgl. des krankheitsfreien Überlebens nach Radiochemotherapie, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-L1 programmed cell death ligand 1)

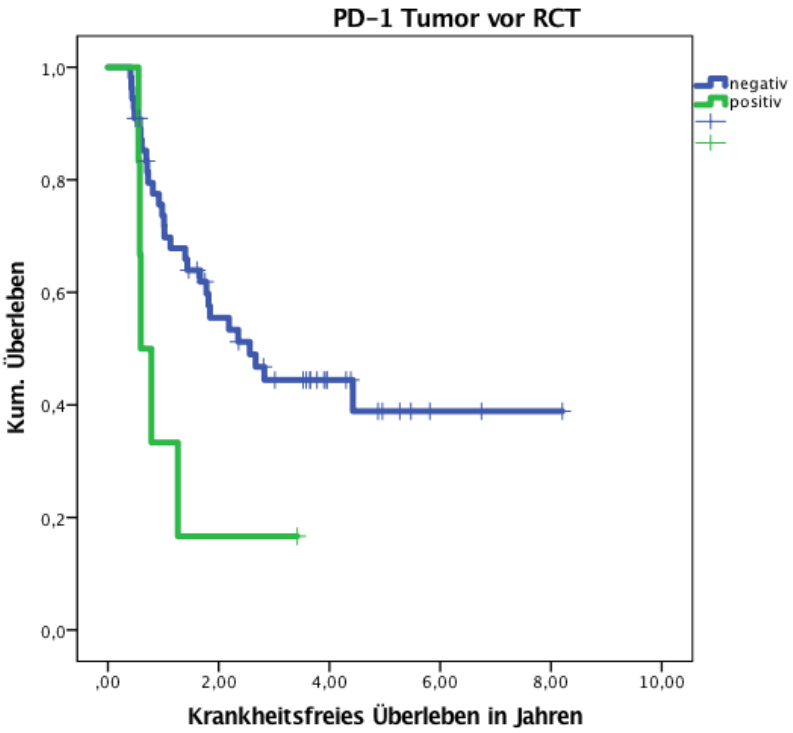

Abbildung 31 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-1 Expression auf Tumorzellen bzgl. des krankheitsfreien Überlebens vor Radiochemotherapie, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-1 programmed cell death protein 1), veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) (Doescher et al., 2020)

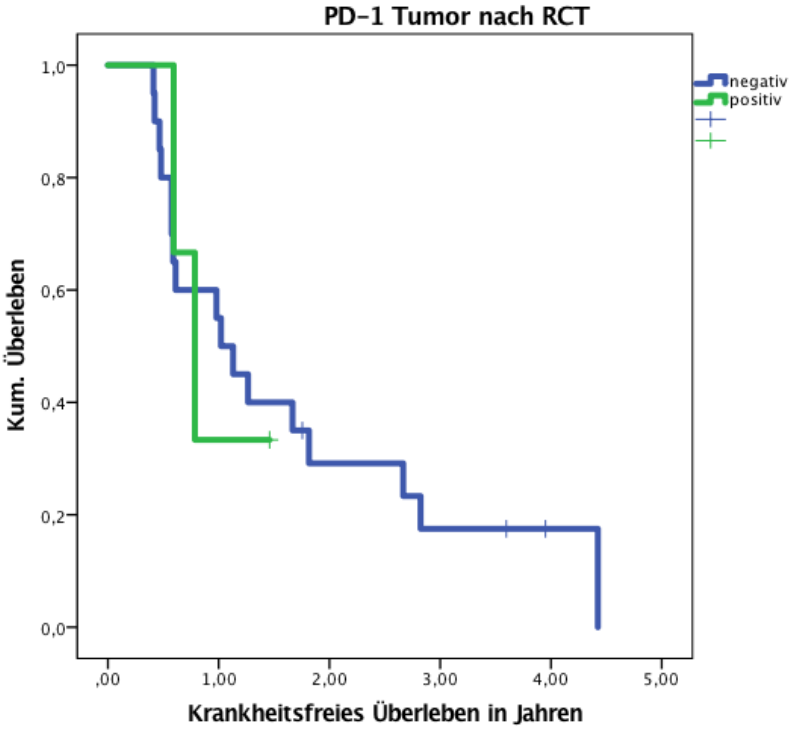

Abbildung 32 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-1 Expression auf Tumorzellen bzgl. des krankheitsfreien Überlebens nach Radiochemotherapie, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-1 programmed cell death protein 1)

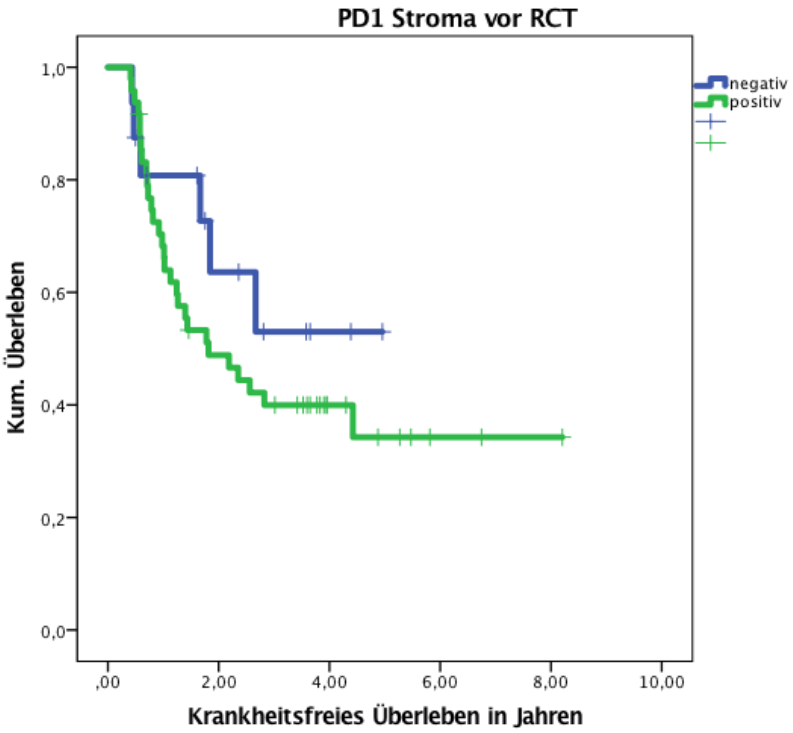

Abbildung 33 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-1 Expression auf Immunzellen des Stromas bzgl. des krankheitsfreien Überlebens vor Radiochemotherapie, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-1 programmed cell death protein 1)

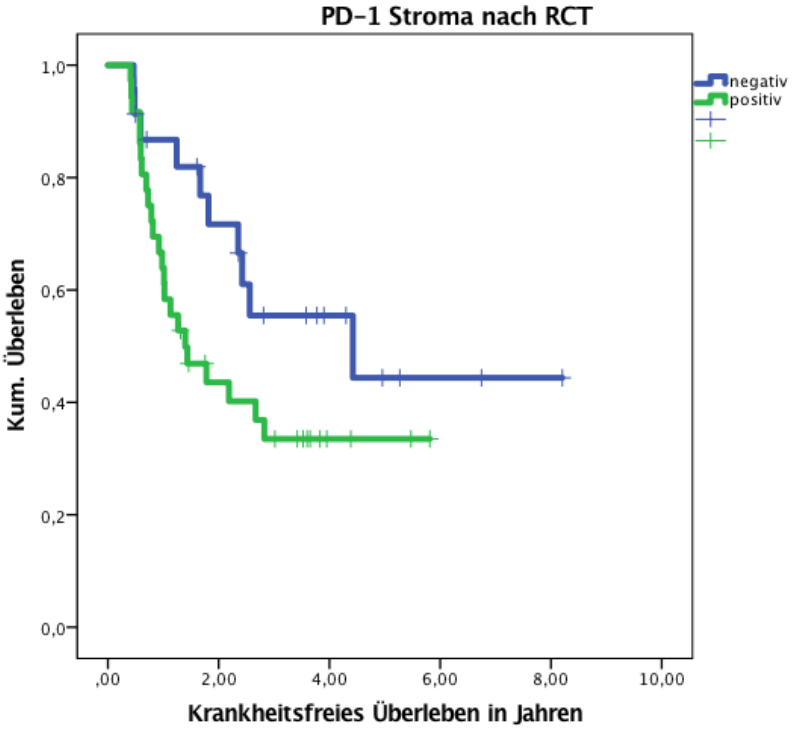

Abbildung 34 Kaplan-Meier-Kurve: Prognostische Relevanz der PD-1 Expression auf Immunzellen des Stromas bzgl. des krankheitsfreien Überlebens nach Radiochemotherapie, Universitätsklinikum Ulm, 2005-2016, (PD-1 programmed cell death protein 1)

3.7 Korrelation der PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas und Tumorzellen vor RCT

Während der Auswertung stellte sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas und der PD-L1 Expression auf Tumorzellen gibt.

Anhand des Korrelationstestes nach Spearman und mit Hilfe des schon ermittelten H-Score konnten wir eine geringe Signifikanz feststellen ($p=0,048$, $r=0,25$).

Somit geht die PD-L1 Expression auf Tumorzellen mit einer geringen PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas einher und umgekehrt.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Unsere Studie zeigt bisher unbekannte Aufschlüsse über das Expressionsverhalten von PD-1, PD-L1 und CD 27 auf, welche im Folgenden näher erläutert werden.

Interessant ist, dass das krankheitsfreie Überleben bei Patienten, die vor der RCT PD-1 negative Tumorzellen haben, signifikant erhöht ist, sich jedoch die PD-1 Expression auf Immunzellen des Stromas und Tumorzellen bei Therapieansprechern und -versagern nicht signifikant voneinander unterscheiden. Durch die RCT verändert sich die PD-1 Expression auf Tumorzellen oder Immunzellen des Stromas nicht signifikant.

Die Gesamtüberlebenszeitanalyse zeigt, dass die PD-1 Expression und die Überlebenszeit der Patienten nicht im Zusammenhang stehen und auch die Rezidiv-Rate in keiner signifikanten Verbindung zu der PD-1 Expression steht.

Bei der Untersuchung des PD-1 Liganden (PD-L1) ist auffallend, dass es eine unterschiedliche PD-L1 Expression auf den Immunzellen des Stromas bei Therapieansprechern und Therapieversagern gibt. Dabei haben Patienten, die an einem posttherapeutischen Tumornachweis leiden, vor der RCT einen niedrigeren H-Score für PD-L1 als Patienten, die keinen posttherapeutischen Tumornachweis haben. Gleichzeitig geht die PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas mit einer geringen PD-L1 Expression auf Tumorzellen einher und umgekehrt.

Die PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas und Tumorzellen der Gesamtkohorte verändert sich durch die RCT nicht signifikant.

Bei der Analyse der Expressionsveränderungen unter den verschiedenen Therapeutika wird deutlich, dass die Art des Therapeutikums keinen signifikanten Einfluss auf PD-L1 Expressionsveränderungen auf den Immunzellen des Stromas

oder Tumorzellen hat.

Das Gesamtüberleben der Patienten hängt nicht vom Expressionsstatus der Immunzellen des Stromas oder der Tumorzellen ab.

Das krankheitsfreie Überleben der Patienten mit negativen Tumorzellen ist signifikant verlängert.

Gleichzeitig steigt die Rezidiv-Häufigkeit signifikant bei Patienten mit positiven PD-L1 Expressionsstatus auf den Tumorzellen vor der RCT.

Die Untersuchung von CD 27 liefert interessante Ergebnisse hinsichtlich der CD27 Expression und Therapieverlauf.

So verändert sich die CD27 Expression durch die RCT auf den Immunzellen signifikant, was dazu führt, dass nach der RCT die CD27 Expression auf den Immunzellen abnimmt.

Gleichzeitig lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der CD27 Expression auf Proben von Therapieversagern und Therapieansprechern feststellen.

Betrachtet man die Proben hinsichtlich Therapieversager und Therapieansprecher, zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei den Therapieversagern hinsichtlich des CD27 Expressionsstatus von Immunzellen vor und nach der RCT. Dabei haben Therapieversager vor RCT einen höheren Score-Wert von 4 und nach RCT einen niedrigeren von 3,39.

Bei der Untersuchung, ob die unterschiedlichen Chemotherapeutika dabei einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Expressionsveränderungen haben, kann keine Signifikanz festgestellt werden.

Die Überlebenszeit der Patienten mit einer erhöhten CD27 Expression auf Immunzellen vor der RCT verlängert sich signifikant (95,8 % vs. 58,1 % 5-Jahres Überleben). Doch Rückschlüsse auf die Rezidiv-Rate (vor RCT p=0,981, nach RCT p=0,745) oder ein krankheitsfreies Überleben lassen sich durch die CD27 Expression nicht ziehen.

Das heißt: Patienten mit erhöhter CD27 Expressionen vor der RCT haben ein durchschnittlich verlängertes Leben, jedoch keine verbesserten Aussichten auf ein rezidiv- oder krankheitsfreies Überleben. Allerdings ist festzuhalten, dass die CD27 Expression auf Immunzellen von Therapieversagern während der RCT signifikant abnimmt, wohingegen sie sich bei Therapieansprechern nicht verändert. Diese Beobachtung passt zum verlängerten Gesamtüberleben von Patienten mit einer höheren CD27 Expression.

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

Das Verfahren der Immunhistologie birgt einige Fallstricke, die vor allem bei der Auswertung zu Messabweichungen und Ergebnisverzerrungen führen kann.
So handelt es sich bei der angewandten Auswertungsmethode um ein subjektives Verfahren, da die Intensitätsbeurteilung von einem Menschen durchgeführt wird. Auch die Beurteilung der gefärbten Areale in den Gewebeproben ist ein prozentualer Schätzwert, der subjektiv durch den Auswerter bestimmt wird.
Da sich die verwendeten Score-Werte aus Intensität und Gewebeanteil errechnen, birgt dieses Verfahren entsprechende Fehlerquellen.
Hinzu kommt, dass die Färbeintensität häufig auch von der verwendeten Antiköpermenge sowie Probenqualität abhängt und dadurch nicht unbedingt Rückschlüsse auf die Expressionsstärke gibt (Döscher, 2015).
Die untersuchten Proben sind in einem Zeitraum von 2005 bis 2016 erfasst worden, wodurch teilweise große Altersunterschiede zwischen den einzelnen Proben vorliegen.
Die Fixierungszeiten der Gewebeblöcke sowie der Lagerungsort der Gewebeblöcke beeinflusst die Färbequalität ebenfalls. Dadurch können bei grundsätzlich gleicher Expressions-Ausprägung unterschiedliche Ausprägungen der Intensitäten entstehen.
Auch technische Fehler während der Gewebevorbehandlung oder des Färbevorganges können dazu führen, dass sich die Färbungen in ihrer Intensität unterscheiden. Es können zum Beispiel immer nur 46 Schnitte in einem Färbelauf im Autostainer gefärbt werden. Hierdurch ist es möglich, dass technisch bedingte Abweichungen zwischen den einzelnen Färbungen entstehen.

Um die Subjektivität der Auswertung zu minimieren, wurden die Schnitte immer in einem 4-Augen-Prinzip ausgewertet.

<u>Klone</u>

Eine weitere Ursache, die dazu führen kann, dass die Ergebnisse von bisherigen Studien abweichen können, kann die Wahl der Antikörper-Klone für die jeweilige Immunfärbung sein.

So scheint es vor allem bei PD-L1 Antikörpern qualitative Unterschiede zu geben. In Bezug auf die Empfindlichkeit wird in einer quantitativen und qualitativen Charakterisierung von zwei PD-L1-Klonen, SP263 und E1L3N, festgestellt, dass viele Fälle eine negative Membranfärbung mit dem E1L3N-Assay aufweisen, jedoch eine messbare Färbung mit dem SP263-Assay zeigen (Smith et al., 2016). Des Weiteren empfiehlt diese Studie aufgrund seiner Färbungsintensität, seines Bewertungsbereichs und seiner Präferenz für Pathologen den SP263 IHC-Assay dem E1L3N IHC-Assay vorzuziehen.

Da in unserer Studie der E1L3N-Klon verwendet wird, birgt dies eine mögliche Fehlerquelle in der Auswertung und kann ein Grund für abweichende Ergebnisse sein.

Demgegenüber steht eine Arbeit von (Gaule et al., 2017), die festzustellen versucht, ob die Antikörperreagenzien austauschbar sind. Dabei wird die Expression von PD-L1-Protein unter Verwendung von sechs monoklonalen Antikörpern (SP142, E1L3N, 9A11, SP263, 22c3 und 28-8) quantitativ verglichen. Gaule et al. kommt zu dem Ergebnis, dass die untersuchten Antikörper in hohem Maße übereinstimmen und dass die auf der Verwendung dieser Antikörper basierenden Ergebnisse übereinstimmende Resultate liefern könnten (Gaule et al., 2017). Sie legen ferner nahe, dass die zuvor beschriebenen Unterschiede in der PD-L1-Expression im Gewebe unabhängig vom verwendeten Antikörper sind und wahrscheinlich auf Tumorheterogenität, Assay-/Plattform-spezifische Variablen oder andere Faktoren zurückzuführen sind (Gaule et al., 2017).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

PD-1

In der vorliegenden Arbeit können keine Veränderungen der PD-1 Expression durch eine RCT beobachtet werden.

In Vorarbeiten anderer Gruppen jedoch konnten diverse Veränderungen festgestellt werden. So war eine Hochregulierung der PD-1-Expression auf CD4C-T-Zellen in HPV-Oropharynxkarzinomen nach RCT zu beobachten, die drei Wochen nach Abschluss der Therapie auftrat und nach der Therapie bis zu einem Jahr lang erhöht blieb (Parikh et al., 2014).

Die PD-1-Expression auf CD4 positiven T-Zellen erhöhte sich nach einer Chemotherapie und einer Ex-vivo-Kultur mit PD-1-blockierenden Antikörpern in 8

von 18 getesteten Proben um das 2,5-fache. Die Radiochemotherapie unterdrückt die zirkulierenden Immunantworten bei Patienten mit HPV-Oropharynxkarzinomen, indem sie das Verhältnis von Effektor Suppressor-Immunozyten und die Regulierung der PD-1-Expression auf CD4 positive-T-Zellen ungünstig verändert. Diese Daten unterstützen nachdrücklich die Prüfung von PD-1-Blockern in Kombination mit einer Standard-Radiochemotherapie für HPV-Oropharynxkarzinomen (Parikh et al., 2014).

Die Studie von (van Meir et al., 2017) beobachtete auch eine erhöhte PD-1-Expression auf CD4C-T-Zellen bei Gebärmutterhalskrebs während und nach der Strahlentherapie und zeigten, dass dies mit der beeinträchtigten T-Zell-Reaktivität gegenüber Influenza-M1-Peptiden (FLU) und der beeinträchtigten Fähigkeit von APCs zur Stimulierung allogener T-Zellen zusammenhängt.
PD-1 ist ein wichtiges Immun-Checkpoint-Protein, das auf aktivierten und erschöpften T-Zellen exprimiert wird und durch Wechselwirkung mit seinem Liganden PD-L1 zur Unterdrückung der T-Zell-Aktivität führt (van Meir et al., 2017). Jedoch wurden auch hier nicht wie bei dem beschriebenen Versuchsaufbau die Verteilung von Immunzellen im Stroma analysiert.

Die unterschiedlichen Ergebnisse zu der hier vorliegenden Studie können zum einen davon abhängen, dass bei (Parikh et al., 2014) die Oropharynxkarzinom-Patienten zu 90,9 % HPV positive Karzinome hatten. In der vorliegenden Studie ist der HPV Status nur bei 38,9 % der Patienten mit Oropharynxkarzinom getestet und davon sind 16,7 % HPV positiv.
Aber auch die Art der Färbung und Auswertung können der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. So wurden bei (Parikh et al., 2014) die peripheren mononukleären Blutzellen untersucht und nicht wie im hier beschriebenen Versuchsaufbau Immunzellen des Stromas und Tumorzellen.
In der vorliegenden Studie wird die PD-1 Expression anhand einer Immunfärbung und des H-Score analysiert.
Während der Versuchsdurchführung ist die Produktion des Primärantiköpers Dianova PD-1 NAT105 eingestellt worden, so dass auf Anti-PD-1 (Hu) aus Maus (Kon JAD1) gewechselt wird. Auch diese Veränderung in unserem Versuchsaufbau kann zu gewissen Schwankungen in den Ergebnissen führen.

Die Gesamtüberlebenszeitanalyse liefert keine Zusammenhänge zwischen der PD-1 Expression und der Überlebenszeit der Patienten.
Zu diesem Ergebnis kam auch (Balermpas et al., 2017), der keine prognostische Signifikanz gegenüber der PD-1-Expression bei Patienten mit KHT nach adjuvanter Radiochemotherapie feststellen konnte.
Das krankheitsfreie Überleben verlängert sich hingegen bei Patienten, die vor der RCT einen negativen Score-Wert hinsichtlich der PD-1 Expression auf Tumorzellen haben (negativer Score Wert 4,15 Jahre, positiver Score-Wert 1,20 Jahre).
Von der PD-1 Expression lassen sich aber keine Vorhersagen auf die Rezidiv-Rate treffen.
Aktuelle Studien gehen davon aus, dass die PD-1-Expression auf regulatorischen T-Zellen mit einem verbesserten Überleben verbunden ist (Schneider et al., 2018).

PD-L1

PD-L1 Expressionsveränderung

Die vorliegende Studie ergibt, dass sich die PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas und Tumorzellen in Kopf-Hals-Karzinomen nicht signifikant durch RCT verändert.
Bisherige Untersuchungen der PD-L1 Expression in Kopf-Hals-Karzinomen zeigen durch die Behandlung mit Cisplatin eine Hochregulierung der PD-L1 Expression (Ock et al., 2017). Der genaue Grund für diese abweichenden Ergebnisse ist unklar, jedoch ist nicht außer Acht zu lassen, dass es sich in der Studie, die zu diesem Ergebnis kommt, um eine sehr kleine Patientenkohorte handelt, bei der sich die PDL-1 Expression bei 9 Patienten von negativ zu positiv verändert (Ock et al., 2017). Mehr als die Hälfte der Proben (N=18) sind bereits vor der Behandlung PD-L1 positiv. Durch die geringe Probandenzahl kann sich die Signifikanz bezüglich der Expressionsveränderung stärker ausprägen.
Eine weitere Abweichung der Studien ist der Entnahmezeitpunkt der Proben. So wurden in der Studie von Ock et al. die Proben nach Behandlung erst bei einem Rezidiv entnommen und nicht wie beim vorliegenden Versuchsaufbau unmittelbar nach CRT (Ock et al., 2017).
Die Proben von Ock et al., bei denen eine Expressionsveränderung festgestellt wurde, besaßen ein besonders großes Zeitintervall von 1,5 bis 33,4 Monaten zwischen den Probenentnahmen (Ock et al., 2017).

Ein weiterer Grund könnte der HPV-Status sein, der in der vorliegenden Studie bei 61,1 % der Patienten unklar ist.
In der Studie von Ock et al. war der HPV-Status bei 88,9 % der Patienten, die eine PD-L1 Expressionsveränderung von negativ zu positiv aufwiesen, negativ (Ock et al., 2017).

Andere Untersuchungen an nicht kleinzelligen Bronchialzell-Karzinomen ergaben, dass durch eine neoadjuvante RCT die PD-L1 Expression auf Tumorzellen abnahm (Fujimoto et al., 2017). Weitere Studien belegen diese Ergebnisse, in denen sogar der gleiche Antikörper-Klon wie in dem hier beschriebenen Versuch verwendet wurde (Sheng et al., 2016).
Der naheliegendste Grund für diesen Unterschied in den Ergebnissen sind zelluläre Unterschiede von Bronchialzell-Karzinomen sowie Kopf-Halskarzinomen und damit ein unterschiedliches Reagieren auf ähnliche Behandlungen. So waren 42 % der Tumore Adenokarzinome, 53 % Plattenepithelkarzinome und 5 % andere Entitäten (Fujimoto et al., 2017). Die Studie von Sheng et al. untersuchte sogar größtenteils nur Adenokarzinome (81,3 %) (Sheng et al., 2016).
Damit handelt es sich in diesen beiden Studien um sehr unterschiedliche Patientengruppen verglichen mit der Kohorten-Auswahl in der vorliegenden Studie, in der 100 % der Patienten an einem Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom litten.

Eine andere Ursache für das Abweichen der Ergebnisse kann eine unterschiedliche Behandlung des Karzinoms sein.
In der Studie von Sheng et al. erhielten beispielsweise 15 Patienten (46,9 %) eine Pemetrexed-basierte Therapie, neun Fälle (28,1 %) wurden mit Paclitaxel-basierter Chemotherapie behandelt. Von acht Patienten (25 %), die EGFR-TKIs (EGFR-Tyrosine kinase inhibitors) erhielten, wurden vier mit Erlotinib plus Chemotherapie behandelt (Sheng et al., 2016).
In der Studie von Fujimoto et al. erhielt die Mehrheit der Patienten (67 %) Vinorelbin plus Platin als CCRT-Therapie (Concurrent chemoradiation therapy). Jedoch hat die Art des Chemotherapeutikums keinen Einfluss auf das Expressionsprofil (Fujimoto et al., 2017).
In der hier vorliegenden Studie erhielten 73 % der Patienten Cisplatin und 10 % Carboplatin als Chemotherapeutikum, 9 % Mitomycin und 3 % Cetuximab. Dabei

ist, wie in der Studie von Fujimoto et al., keine Expressionsveränderung durch unterschiedliche Chemotherapeutika festzustellen.

Ein weiterer Grund für die abweichenden Ergebnisse könnten unterschiedliche Bestrahlungsdosen sein. In dem hier beschriebenen Versuch liegt eine durchschnittliche Bestrahlung von 67,66 Gy vor. In der Studie von Fujimoto et al. hingegen wurden 84 % der Patienten mit 40 Gy und 16 % mit 50 Gy bestrahlt, wobei es sich um eine neoadjuvante Bestrahlung handelt (Fujimoto et al., 2017).

PD-L1 Expression und Gesamtüberleben

Des Weiteren sind in der vorliegenden Studie keine Zusammenhänge zwischen dem Gesamtüberleben und der PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas und Tumorzellen zu finden.

Zu diesem Ergebnis kommen auch Karim et al., die die PD-L1 Expression bei Patienten mit Gebärmutterhalskrebs untersucht haben (Karim et al., 2009).

Andere retrospektive Analysen von Patienten mit verschiedenen Arten von Malignomen zeigen hingegen einen Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression bei Tumoren und einer ungünstigen Prognose. Dabei wurden Mammakarzinome, Ovarialkarzinome, Ösophaguskarzinome, Nierenkarzinome und Magenkarzinome untersucht (Ghebeh et al., 2006, Hamanishi et al., 2007, Ohigashi et al., 2005, Thompson et al., 2006 Wu et al., 2006).

PD-L1 Expression stratifiziert nach Therapieansprechen

Auffallend in der vorliegenden Studie ist eine unterschiedliche PD-L1 Expression auf den Immunzellen des Stromas bei Therapieansprechern und Therapieversagern. Dabei haben Patienten, die an einem posttherapeutischen Tumornachweis litten, vor der RCT einen niedrigeren H-Score als Patienten, die keinen posttherapeutischen Tumornachweis hatten. Allerdings nivelliert sich dieser Effekt posttherapeutisch, da hier kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit vollständigem Ansprechen und Patienten mit Tumorresiduum bestand.

In der Literatur wird eine erhöhte PD-L1 Expression auf Tumorzellen mit einer erhöhten Malignität von Tumorzellen nach einer Krebsbehandlung in Verbindung gebracht. Eine Studie berichtet, dass eine erhöhte PD-L1-Expression die Resistenzreaktion in Lungenkrebszellen fördert (Zhang et al., 2016).

Eine andere Studie zeigt, dass eine hohe PD-L1-Expression mit einer hohen proliferativen Aktivität und dem Phänotyp des epithelialen-mesenchymalen Übergangs zusammenhängt (Shimoji et al., 2016).

In den hier vorliegenden Ergebnissen wird das Therapieansprechen durch einen niedrigen PD-L1 Score auf den Immunzellen des Stromas verbessert. Dies kann daran liegen, dass die bisherigen Studien sich auf Lungenkarzinome, Gebärmutterhalskarzinome oder den Tumoranteil in Kopf-Hals-Karzinomen beziehen und nicht wie im vorliegenden Fall auch die Immunzellen des Stromas untersucht werden.
In der Literatur ist der prognostische Wert des Ausgangs-PD-L1-Expressionsstatus bei Lungenkrebs immer noch umstritten. Jedoch kann eine positive PD-L1-Expression als Prädiktor für das Ansprechen auf eine platinbasierte Chemotherapie nicht nur bei fortgeschrittenem NSCLC, sondern auch bei Tumoren im Frühstadium dienen (Mino-Kenudson, 2016).

PD-L1 Expression Krankheitsfreien Überleben und Rezidiv

Die vorliegende Studie zeigt, dass das krankheitsfreie Überleben der Patienten mit negativem Score auf Tumorzellen signifikant erhöht ist und gleichzeitig steigt die Rezidiv-Häufigkeit bei Patienten mit positiven PD-L1 Expressionsstatus auf den Tumorzellen signifikant. Dieses Ergebnis der vorliegenden Studie bestätigt die bisherigen Forschungsergebnisse und lässt auf einen prognostischen Nachteil für Patienten mit positiver PD-L1 Expression auf Tumorzellen schließen (Zhang et al., 2016, Shimoji et al., 2016).

Durch die erhöhte PD-L1 Expression ist es dem Tumor möglich, erfolgreich vor dem körpereigenen Immunsystem zu flüchten (Zandberg & Strome, 2014).
T-Zellen, die während des Krebsgeschehens chronisch Antigenen ausgesetzt sind, neigen zu einem Phänotypwechsel, bei dem ihre Effektorfunktionen erheblich beeinträchtigt werden, wodurch das Fortschreiten der Krankheit ermöglicht wird. Diese erschöpften oder dysfunktionalen T-Zellen sind nicht in der Lage, persistierende Tumore und Krankheitserreger optimal zu kontrollieren (Wherry & Kurachi, 2015).
Aus diesem Grund spricht eine erhöhte PD-L1 Expression für eine verschlechterte

Prognose.

Dem gegenüber steht die Studie von Balermpas et al., die sich mit dem prognostischen Einfluss von PD-1/PD-L1 im Zusammenhang mit dem HPV16-Status bei Kopf-Hals-Karzinomen beschäftigt (Balermpas et al., 2017).

Laut Balermpas et al. hatten Patienten mit hoher PD-L1-Expression ein signifikant überlegenes Gesamtüberleben (Balermpas et al., 2017).

Demnach ist die Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens bei Patienten vor allem bei erhöhter PD-L1 Expression verbessert.

Die Ursache für dieses unterschiedliche Ergebnis ist unklar, könnte aber mit dem HPV-Status und der Tumorlokalisation zusammenhängen. In der Studie von Balermpas et al. waren 37,9 % der Tumore HPV-16 positiv bzw. 62,1 % HPV16-negativ und 60,87 % der Karzinome ein Oropharynxkarzinom (Balermpas et al., 2017).

Balermpas et al. fand heraus, dass die prognostische Signifikanz der PD-L1 Expression mit dem HPV-Status zusammenhängt. Bei Patienten mit HPV16-DNA-negativen Tumoren war eine hohe PD-L1-Expression ein starker prognostischer Parameter für das Gesamtüberleben. Im Gegensatz dazu hatte der PD-L1-Status keinen Einfluss auf das klinische Ergebnis bei HPV16-positiven Patienten.

In der vorliegenden Studie sind 53,7 % der Tumore Oropharynxkarzinome und der HPV-Status bei 61,1 % unklar.

Des Weiteren wurde bei Balermpas et al. die PD-L1 Expression nicht in Tumor- und Stromagewebe unterteilt und unterschieden (Balermpas et al., 2017). In der vorliegenden Studie wird die PD-L1 Expression in Immunzellen des Stroma und Tumorzellen separat untersucht und dieses in der Auswertung unabhängig voneinander betrachtet. Alleine dieser Unterschied in der Auswertung der Ergebnisse kann zu den abweichenden Resultaten führen.

CD27

In der vorliegenden Studie stellt sich heraus, dass sich die CD27 Expression auf Immunzellen des Tumorstromas durch die RCT Behandlung verändert.

Die CD27 Expression nimmt signifikant bei den Therapieversagern ab. Demnach scheint es einen Zusammenhang zwischen der CD27 Expressionsveränderung und dem Therapieansprechen zu geben. Offensichtlich kommt es nicht direkt auf die Expression von CD27 auf Immunzellen an, sondern eher darauf, wie stark die

Expression durch die RCT abnimmt.
Dieser Verdacht wird dadurch belegt, dass die CD27 Expression vor und nach der RCT als Einzelnes gesehen keinen signifikanten Faktor für das Therapieansprechen oder -versagen darstellt.
Die aktuelle Literatur weist auf die Antitumorwirkung des CD27-Signalwegs hin. So wurde in zwei verschiedenen Lymphom-Modellen gezeigt, dass ein agonistischer Anti-CD27-mAb, der als einzelnes Reagenz verabreicht wird, tumortragende Mäuse vollständig schützen kann (French et al., 2007).

Verglichen mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie scheint nicht nur die direkte Expression und Aktivierung von CD27 wichtig für das Therapieansprechen zu sein, sondern auch die Stärke der Expressionsveränderungen, die durch die RCT auftreten.

In der Kaplan-Meier-Analyse konnte mittels Log-Rank-Test ein signifikanter Vorteil im Gesamtüberleben für Patienten mit CD27 positiven Immunzellen festgestellt werden (95,8 % vs. 58,1 % 5-Jahres Überleben, p=0,042).
Das deutlich verbesserte Überleben der Patienten, die CD27 vermehrt exprimieren, bestätigt die bisherigen Forschungsergebnisse, dass CD27 eine antitumorale Wirkung hat (French et al., 2007).

Nicht außer Acht zu lassen ist jedoch, dass sich die bisherigen Forschungsarbeiten bezüglich mAbs und CD27 vor allem auf Lymphom- und Leukämieerkrankungen beziehen (Ramakrishna et al., 2015, Vitale et al., 2012).
Jedoch zeigen die Ergebnisse, dass auch in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen der CD27/CD70 Signalweg großes Potential darstellt um die Therapieoptionen zu verbessern.
Eine Studie zeigte, dass die Population von CD8 positiven CD45RA CD27 negativen T-Zellen im Blutkreislauf von Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen stark zunahm (Kuss et al., 2003).
Eine niedrige CD27-Expression ist ein ungünstiger Marker bei multiplen Myelom-Patienten, der mit einem kürzeren Überleben von multiplen Myelom-Patienten zusammenhängt (Morgan et al., 2006, Moreau et al., 2006).
In einer Studie wurden die Veränderungen der Genexpression zwischen Diagnose

und Rückfall beim multiplen Myelom untersucht. Überraschenderweise sind nur fünf Gene von 273 untersuchten beim Rückfall signifikant unterexprimiert (Krzeminski et al., 2016).
Eins dieser untersuchten Gene ist CD27 und zeigt damit, genau wie in den vorliegenden Ergebnissen, dass sich die CD27 Expression durch eine Behandlung verändern kann und mit dem Erfolg der Behandlung zusammenhängt.

4.3 Ausblick

Da in der vorliegenden Studie hinsichtlich der PD-1 Expression in Immunzellen des Stromas keine Veränderung durch RCT festgestellt werden kann, jedoch eine solche Veränderung in peripheren Blutproben festgestellt wird, sollte dieser Unterschied in zukünftigen Forschungsarbeiten genauer beleuchtet werden.
In dieser Studie wird die PD-1 Expression auf Tumorzellen betrachtet und dabei gezeigt, dass Patienten mit negativer PD-1 Expression auf Tumorzellen ein signifikant verbessertes krankheitsfreies Überleben aufweisen. Ob dies nun therapeutische Konsequenzen hat oder Angriffspunkte für zukünftige Therapien liefert, ist in nachfolgenden Forschungsarbeiten zu prüfen, da eine PD-1 Expression auf Tumorzellen generell ungewöhnlich ist.
Die Forschungsergebnisse zu PD-L1 weichen zum Teil vom bisherigen Forschungsstand ab. In der Studie ist keine Veränderung der PD-L1 Expression in Kopf-Hals-Karzinomen durch eine RCT festzustellen. Daher sollte vor allem in Zukunft genauer untersucht werden, welche Ursache es hat das in Kopf-Hals-Karzinomen die RCT zu keiner signifikanten Veränderung der PD-L1 Expression führt. Dabei sollte vor allem ein Augenmerk auf die Wirkung der RCT auf verschiedene Krebsarten berücksichtigt werden, da dieses ein Grund für die unterschiedlichen Expressionsveränderungen sein kann. Aber auch die unterschiedlichen Behandlungsmethoden können zu den voneinander abweichenden Ergebnissen führen. Daher sollten auch die Auswirkung von unterschiedlichen Behandlungsmethoden im Zusammenhang mit der PD-L1 Expressionsveränderung untersucht werden.
Mittlerweile werden in der Klinik therapeutische monoklonale Antikörper eingesetzt, wobei sich die gezielte Behandlung des PD-1/PD-L1-Signalwegs als äußerst wirksam erweist. Bei einer Reihe von Krebstypen werden Berichte über dauerhafte Reaktionen veröffentlicht (D. S. Chen & Mellman, 2017).

Obwohl die Wirksamkeit und Handhabbarkeit bei einem erheblichen Anteil der Patienten höher ist als bei den herkömmlichen und gezielten Krebstherapien, sprechen andere Patienten überhaupt nicht auf PD-1/PD-L1-Blockade an oder erlangen mit der Zeit therapeutische Resistenz (Zaretsky et al., 2016, Ribas et al., 2016, O'Donnell et al., 2017).
Daher ist es wichtig herauszufinden, woran es liegt, dass Patienten diese Reaktionen entwickeln, um sie dann ggf. vor dem Beginn einer solchen Behandlung herauszufiltern.

Wie die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, ist der Therapieerfolg der RCT bei Patienten, welche vor der RCT einen niedrigeren H-Score auf Immunzellen des Stromas haben, geringer als bei Patienten mit einem höheren H-Score. Dies kann ein erster Ansatz sein um eine Vorauswahl der Therapie treffen zu können. Jedoch müssen Patienten mit einem geringen H-Score vor der RCT, daraufhin untersucht werden, wie sie auf neue Immuncheckpoint-Therapien reagieren. Denn diese neuen Therapien greifen zum Teil an der Blockade des PD-L1 Signalwegs an.
Sie wirken, indem sie den auf Tumorzellen exprimierten PD-1-Liganden blockieren. In den hier beschriebenen Ergebnissen haben die Patienten, bei denen die RCT versagt, eine besonders geringe PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas. Daher ist zu prüfen, ob Therapien, die genau an diesem Immuncheckpoint angreifen, diesbezüglich überhaupt hilfreich sein können, da bisherige Therapien vor allem an den auf Tumorzellen exprimierten PD-L1 angreifen.
Da das Stroma aus einer Vielzahl verschiedener Immunzellen besteht, muss zunächst geklärt werden, welche Zellarten in einer geringeren Expression auftreten. Eine Blockade des PD-1/PD-L1 Signalweges erscheint in jedem Fall als alleiniger Ansatz wenig erfolgversprechend bei diesen Patienten.
Betrachtet man den direkten Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression auf Immunzellen des Stromas und der PD-L1 Expression auf Tumorzellen vor RCT so scheint ein schwacher Zusammenhang zu bestehen. Dieser ist jedoch so gering, dass kein eindeutiger Zusammenhang nachgewiesen werden kann.
Daher liefert die Untersuchung der Expression der Immunzellen im Stroma einen guten Ansatz, um eine Vorauswahl der Patienten zu treffen, die auf konventionelle Therapien nicht ansprechen.
Die Ergebnisse der Studie zu CD27 belegen den bisherigen Stand der Forschung

und legen nahe, dass auch in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen der CD27 Signalweg großes Potential für einen verbesserten Therapieerfolg liefert.
Interessant für zukünftige Fragestellungen wäre es, herauszufinden, in wie weit die Behandlungsprognosen von den Patienten verbessert werden, die ohnehin schon eine erhöhte CD27 Expression besitzen. Zum Beispiel durch eine mAb Therapie, oder, ob eine solche Therapie in diesen Fällen keine Verbesserung der Prognose erzielt. Gleichzeitig gilt es natürlich herauszufinden, wie Patienten, die eine niedrige CD27 Expression besitzen und ein deutlich verschlechtertes Gesamtüberleben haben, von mAb-Therapien profitieren.

Bisherige Studien haben gezeigt, dass der Ligand CD70 auf humanen peripheren DCs im Ruhezustand fehlt, aber durch TNF-α, TLR-Agonisten oder Bestrahlung hochreguliert wird (Huang et al., 2011, Krause et al., 2009, Oosterhoff et al., 2013). Dies könnte ein Versuch des Immunsystems sein, den Verlust der CD27 Rezeptoren zu kompensieren. Interessant wäre herauszufinden, ob bei Patienten, die als Therapieversager gelten, die Hochregulation von CD70 durch die Bestrahlung ebenfalls stattfindet. Falls dies der Fall ist, kann dies ein Indiz dafür sein, dass auch bei diesen Patienten eine agonistische Anti-CD27-mAb Therapie nicht anschlägt.
Falls jedoch die Hochregulierung von CD70 bei genau diesen Patienten nicht stadtfindet, stellt die agonistische Anti-CD27-mAb Therapie großes Erfolgspotential dar, da ggf. die verminderte CD27 Expression der Therapieversager durch eine Vermehrung des Aktivierungsliganden CD70 ausgeglichen werden kann.

5 Zusammenfassung

Bislang gibt es vereinzelte Studien zu verschiedenen Tumorentitäten, welche Veränderungen des Immunsystems unter Radiochemotherapie (RCT) beobachtet haben. Ziel des hier beschriebenen Projektes ist es, Therapieversager auf eine primäre RCT bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomen näher zu untersuchen. Hierfür sind die Tumore dieser Patienten auf molekularer Ebene bezüglich der Expression von CD27, PD-1 (Programmed cell death protein 1) und PD-L1 (Programmed cell death 1 ligand 1) vor und nach RCT charakterisiert worden.

In der vorliegenden Studie wurde eine retrospektive Analyse von 67 gepaarten Patienten-Biopsien vorgenommen, die routinemäßig gewonnen und immunhistologisch gefärbt und analysiert wurden. Alle Patientenproben wurden in einem standardisierten Verfahren mit den Antikörpern PD-1, PD-L1 und CD27 angefärbt und mittels einem H-Score (PD-1 und PD-L1) und einem immunhistologischen-Score (CD27) ausgewertet.

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von T-Tests und einer Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt.

Die CD27 Expression auf Immunzellen ist nach der RCT ($p=0,019$) signifikant vermindert und gleichzeitig ist ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben ($p=0,042$) bei Patienten mit erhöhter CD27 Expression festzustellen.

Die PD-1 Expression verändert sich weder auf Immunzellen des Stromas noch auf Tumorzellen signifikant durch die RCT. Die Gesamtüberlebenszeit-Analyse zeigt keinen signifikanten Zusammenhang mit der PD-1 Expression und dem Gesamtüberleben.

Die PD-L1 Expression ist auf den Immunzellen des Stromas bei Therapieansprechern signifikant erhöht, verglichen mit der PD-L1 Expression auf den Immunzellen des Stromas von Therapieversagern ($p=0,008$). Die Studie zeigt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der PD-L1 Expression und der Gesamtüberlebenszeit.

Die Auswirkungen einer konventionellen RCT scheinen vor allem bei der CD27 und PD-L1 Expression Folgen zu haben. Die PD-1 Expression wird durch die RCT nicht signifikant verändert.

Für zukünftige Behandlungen scheint vor allem der Zusammenhang der CD27 Expression auf Immunzellen und ein verbessertes Gesamtüberleben bei erhöhter

CD27 Expression großes Potential für eine CD27-Agonisten-Behandlung darzustellen.

6 Literarturverzeichnis

1 Agrawal, N., Frederick, M. J., Pickering, C. R., Bettegowda, C., Chang, K., Li, R. J., Myers, J. N.: Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*. 333: 1154-1157 (2011)

2 Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Grees, D. M., Byrd, D. R., Winchester, D. P.: 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: 93-99 (2017)

3 Arens, R., Tesselaar, K., Baars, P. A., Van Schijndel, G. M. W., Hendriks, J., Pals, S. T., Van Lier, R. A. W.: Constitutive CD27/CD70 interaction induces expansion of effector-type T cells and results in IFNγ-mediated B cell depletion. *Immunity*. 15: 801-812 (2001)

4 Arnold, K. M., Flynn, N. J., Raben, A., Romak, L., Yu, Y., Dicker, A. P., Sims-Mourtada, J.: The Impact of Radiation on the Tumor Microenvironment: Effect of Dose and Fractionation Schedules. *Cancer Growth and Metastasis*. 11: 1-17 (2018)

5 B. A. Stuck, N. Rothmeier, S. Mattheis, N. Dominas, S. L.: *Aktueller Stand Salvage-chirurgischer Therapiekonzepte bei Rezidivtumoren des Larynx und Pharynx*. New York: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart. 35: 323-329 (2017)

6 Balermpas, P., Rödel, F., Krause, M., Linge, A., Lohaus, F., Baumann, M., Fokas, E.: 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 (2017)

7 Baliga, S., Kabarriti, R., Ohri, N., Haynes–Lewis, H., Yaparpalvi, R., Kalnicki, S., & Garg, M. K.: Stereotactic body radiotherapy for recurrent head and neck cancer: A critical review. *Head and Neck*. 39: 595-601 (2017)

8 Bernier, J., Domenge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefèbvre, J. L., Greiner, R. H., Van Glabbeke, M.: Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*. 350: 1945-1952 (2004)

9 Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R. K.,

Ang, K. K.: Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *The Lancet Oncology*. 11: 21-28 (2010)

10 Boots, F., Breuninger, H., Draf, W., Ganzer, U., Glanz, H., Hagen, R., Werner, J. A.: Onkologie des kopf-hals-bereiches. *Laryngo- Rhino- Otologie*. 79: 350-354 (2000)

11 Bourhis, J., Lefebvre, J. L., & Vermorken, J. B.: Cetuximab in the management of locoregionally advanced head and neck cancer: Expanding the treatment options? *European Journal of Cancer*. 46: 1979-1989 (2010)

12 Brahmer, J. R., Drake, C. G., Wollner, I., Powderly, J. D., Picus, J., Sharfman, W. H., Topalian, S. L.: Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *Journal of Clinical Oncology*. 28: 3167-3175 (2010)

13 Budach, W., Hehr, T., Budach, V., Belka, C., & Dietz, K.: A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer*. 6: 28 (2006)

14 Burris, H. A., Infante, J. R., Ansell, S. M., Nemunaitis, J. J., Weiss, G. R., Villalobos, V. M., Bullock, T.: Safety and activity of varlilumab, a novel and first-in-class agonist anti-CD27 antibody, in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 35: 2028-2036 (2017)

15 Burtness, B., Harrington, K. J., Greil, R., Soulières, D., Tahara, M., de Castro, G., Yorio, J.: Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 394: 1915-1928 (2019)

16 Butte, M. J., Peña-Cruz, V., Kim, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H.: Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Molecular Immunology*. 45: 3567-3572 (2008)

17 Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Gillison, M. L.: Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States.

Journal of Clinical Oncology. 29: 4294-4301 (2011)

18 Chen, D. S., & Mellman, I.: Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 541: 321-330 (2017)

19 Clavel, M., Vermorken, J. B., Cognetti, F., Cappelaere, P., Mulder, P. H. M. d., Schornagel, J. H., Snow, G. B.: Randomized comparison of cisplatin, methotrexate, bleomycin and vincristine (CABO) versus cisplatin and 5-fluorouracil (CF) versus cisplatin (C) in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: A phase III study of the EORTC head a. *Annals of Oncology*. 5: 521-526 (1994)

20 Cogliano, V., Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., & El Ghissassi, F.: Smokeless tobacco and tobacco-related nitrosamines. *Lancet Oncology*. 5: 708 (2004)

21 de Jong, R., Loenen, W. A., Brouwer, M., van Emmerik, L., de Vries, E. F., Borst, J., & van Lier, R. A.: Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 146: 2488-2494 (1991)

22 Denis, F., Garaud, P., Bardet, E., Alfonsi, M., Sire, C., Germain, T., Calais, G.: Final results of the 94-01 French head and neck oncology and radiotherapy group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 22: 69-76 (2004)

23 Doescher J., Minkenberg P., Laban S., Kostezka U., von Witzleben A., Hoffmann TK., Schuler PJ., Weissinger SE.: Immune checkpoint expression in HNSCC patients before and after definitive chemoradiotherapy. Head Neck. 43: 778-787 (2020)

24 Döscher, J. C.: *Molekularbiologischer und infektiologischer Vergleich von HNSCC und SNSCC hinsichtlich ihrer Metastasierungsrate*. Med Dissertation, Universität München (2015)

25 Duprez, F., Madani, I., Bonte, K., Boterberg, T., Vakaet, L., Derie, C., De Neve, W.: Intensity-modulated radiotherapy for recurrent and second primary head and neck cancer in previously irradiated territory. *Radiotherapy and Oncology*. 93: 563-569 (2009).

26 Edge, S. B., & Compton, C. C.: The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals*

of Surgical Oncology. 17: 1471-1474 (2010)

27 Ferris, R. L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., Gillison, M. L.: Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*. 375: 1856-1867 (2016)

28 Ferris, Robert L.: Immunology and immunotherapy of head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 33: 3293-3304 (2015)

29 Ferris, R. L., Jaffee, E. M., & Ferrone, S.: Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: Clinical response, cellular immunity, and immunoescape. *Journal of Clinical Oncology*. 28: 4390-4399 (2010)

30 Forastiere, A. A., Metch, B., Schuller, D. E., Ensley, J. F., Hutchins, L. F., Triozzi, P., Von Hoff, D. D.: Randomized comparison of cisplatin plus fluorouracil and carboplatin plus fluorouracil versus methotrexate in advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck: A southwest oncology group study. *Journal of Clinical Oncology*. 10: 1245-1251 (1992)

31 French, R. R., Taraban, V. Y., Crowther, G. R., Rowley, T. F., Gray, J. C., Johnson, P. W., Glennie, M. J.: Eradication of lymphoma by CD8 T cells following anti-CD40 monoclonal antibody therapy is critically dependent on CD27 costimulation. *Blood*. 109: 4810-4815 (2007)

32 Fujimoto, D., Uehara, K., Sato, Y., Sakanoue, I., Ito, M., Teraoka, S., Tomii, K.: Alteration of PD-L1 expression and its prognostic impact after concurrent chemoradiation therapy in non-small cell lung cancer patients. *Scientific Reports*. 7: 11373 (2017)

33 Galbiatti, A. L. S., Padovani-Junior, J. A., Maníglia, J. V., Rodrigues, C. D. S., Pavarino, É. C., & Goloni-Bertollo, E. M.: Head and neck cancer: Causes, prevention and treatment. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 79: 239-247 (2013)

34 Gaule, P., Smithy, J. W., Toki, M., Rehman, J., Patell-Socha, F., Cougot, D., Rimm, D. L.: A quantitative comparison of antibodies to programmed cell death 1 ligand 1. *JAMA Oncology*. 3: 256-259 (2017)

35 Ghebeh, H., Mohammed, S., Al-Omair, A., Qattan, A., Lehe, C., Al-Qudaihi, G., Dermime, S. D.: The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: Correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia*. 8: 190-198 (2006)

36 Gillison, M. L., Broutian, T., Pickard, R. K. L., Tong, Z. Y., Xiao, W., Kahle, L., Chaturvedi, A. K.: Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 307: 693-703 (2012)

37 Glisson, B. S., Murphy, B. A., Frenette, G., Khuri, F. R., & Forastiere, A. A.: Phase II trial of docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Oncology*. 20: 1593-1599 (2002)

38 Goodwin, W. J.: Salvage Surgery for Patients With Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Upper Aerodigestive Tract: When Do the Ends Justify the Means? *The Laryngoscope*. 110: 1-18 (2000)

39 Grandis, J. R., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Tweardy, D. J.: Levels of TGF-α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *Journal of the National Cancer Institute*. 90: 824-832 (1998)

40 Gravestein, L. A., Nieland, J. D., Kruisbeek, A. M., & Borst, J.: Novel mAbs reveal potent co-stimulatory activity of murine CD27. *International Immunology*. 7: 551-557 (1995)

41 Greenwald, R. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H.: THE B7 FAMILY REVISITED. *Annual Review of Immunology*. 23: 515-548 (2005)

42 Hall, S. F., Groome, P. A., Irish, J., & O'Sullivan, B.: The natural history of patients with squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Laryngoscope*. 118: 1362-1371 (2008)

43 Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K., Fujii, S.: Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 3360-3365 (2007)

44 Han, X., & Vesely, M. D.: Stimulating T Cells Against Cancer With Agonist Immunostimulatory Monoclonal Antibodies. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 342: 1-25 (2019)

45 Haque, R., Contreras, R., McNicoll, M. P., Eckberg, E. C., & Petitti, D. B.: Surgical margins and survival after head and neck cancer surgery. *BMC Ear, Nose and Throat Disorders*. 6: 2 (2006)

46 Hayakawa, Y., & Smyth, M. J.: CD27 Dissects Mature NK Cells into Two Subsets with Distinct Responsiveness and Migratory Capacity. *The Journal of Immunology*. 176: 1517-1524 (2006)

47 Held, K. D.: Radiobiology for the Radiologist, 6th ed., by Eric J. Hall and Amato J. Giaccia. *Radiation Research*. 166: 816-817 (2006)

48 Herman, J. M., Chang, D. T., Goodman, K. A., Dholakia, A. S., Raman, S. P., Hacker-Prietz, A., Koong, A. C.: Phase 2 multi-institutional trial evaluating gemcitabine and stereotactic body radiotherapy for patients with locally advanced unresectable pancreatic adenocarcinoma. In *Cancer*. 121: 1128-1137 (2015)

49 Huang, J., Wang, Q. J., Yang, S., Li, Y. F., El-Gamil, M., Rosenberg, S. A., & Robbins, P. F.: Irradiation enhances human T-cell function by upregulating CD70 expression on antigen-presenting cells in vitro. *Journal of Immunotherapy*. 34: 327-335 (2011)

50 Jham, B. C., & Freire, A. R. D. S.: Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 72: 704-708 (2006)

51 Johansen, L. V., Overgaard, J., & Elbrønd, O.: Pharyngo-cutaneous fistulae after laryngectomy. Influence of previous radiotherapy and prophylactic metronidazole. *Cancer*. 61: 673-678 (1988)

52 Joseph, D. L., & Shumrick, D. L.: Risks of Head and Neck Surgery in Previously Irradiated Patients. *Archives of Otolaryngolog*. 97: 381-384 (1973)

53 Kaatsch, P., & Spix, C.: Krebs in Deutschland für 2015 / 2016. *Robert Koch Institut*. 12: 24 (2019)

54 Karatzanis, A. D., Psychogios, G., Waldfahrer, F., Zenk, J., Hornung, J., Velegrakis, G. A., & Heinrich, I.: T1 and T2 hypopharyngeal cancer treatment with laser microsurgery. *Journal of Surgical Oncology*. 102: 27-33 (2010)

55 Karatzanis, A. D., Psychogios, G., Zenk, J., Waldfahrer, F., Hornung, J., Velegrakis, G. A., & Iro, H.: Evaluation of available surgical management options for early supraglottic cancer. *Head and Neck*. 32: 1048-1055 (2010)

56 Karim, R., Jordanova, E. S., Piersma, S. J., Kenter, G. G., Chen, L., Boer, J. M., Van Der Burg, S. H.: Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 15: 6341-6347 (2009)

57 Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. PD-1 and Its Ligands

in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology*. 26: 677-704 (2008)

58 Keller, A. M., Schildknecht, A., Xiao, Y., van den Broek, M., & Borst, J.: Expression of Costimulatory Ligand CD70 on Steady-State Dendritic Cells Breaks CD8+ T Cell Tolerance and Permits Effective Immunity. *Immunity*. 29: 934-946 (2008)

59 Khattab, J., & Urba, S. G.: Chemotherapy in head and neck cancer: Overview of Newer agents. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 13: 753-768 (1999).

60 Kim, E. S., Kies, M., & Herbst, R. S.: Novel therapeutics for head and neck cancer. *Current Opinion in Oncology*. 14: 334-342 (2002)

61 Klein, U., Rajewsky, K., & Küppers, R.: Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *Journal of Experimental Medicine*. 188: 1679-1689 (1998)

62 Krause, P., Bruckner, M., Uermösi, C., Singer, E., Groettrup, M., & Legler, D. F.: Prostaglandin e2 enhances T-cell proliferation by inducing the costimulatory molecules OX40L, CD70, and 4-1BBL on dendritic cells. *Blood*. 113: 2451-2460 (2009)

63 Kruchten, A.: Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, eine retrospektive Analyse von 215 Fällen unter besonderer Berücksichtigung der onkologischen Resultate multimodaler Therapiekonzepte sowie deren Nebenwirkungen. Med Dissertation, Universität Giessen (2011)

64 Krzeminski, P., Corchete, L. A., García, J. L., López-Corral, L., Fermiñán, E., García, E. M., Gutiérrez, N. C.: Integrative analysis of DNA copy number, DNA methylation and gene expression in multiple myeloma reveals alterations related to relapse. *Oncotarget*. 7: 80664-80679 (2016)

65 Kuss, I., Donnenberg, A. D., Gooding, W., & Whiteside, T. L.: Effector CD8+CD45RO-CD27-T cells have signalling defects in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *British Journal of Cancer*. 88: 223-230 (2003)

66 Laban, S., Doescher, J., Schuler, P. J., Brunner, C., Veit, J. A., Hoffmann, T. K., & Bullinger, L.: Immunotherapy of head and neck tumors: Highlights of the ASCO Meeting2015. *HNO*. 63: 612-619 (2015)

67 Lalami, Y., & Awada, A.: Innovative perspectives of immunotherapy in head and neck cancer. From relevant scientific rationale to effective clinical practice. *Cancer Treatment Reviews*. 43: 113-123 (2016)

68 Lang, S., Wollenberg, B., Dellian, M., Steuer-Vogt, M. K., Schwenzer, K., Sautier, W., Hölzel, D.: Klinische und epidemiologische daten zu malignomen des Kopf-Hals-Bereichs. *Laryngo- Rhino- Otologie*. 81: 499-508 (2002)

69 Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Freeman, G. J.: PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*. 2: 261-268 (2001)

70 Lee, S. C., Srivastava, R. M., López-Albaitero, A., Ferrone, S., & Ferris, R. L.: Natural killer (NK):dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity. *Immunologic Research*. 50: 248-254 (2011)

71 Linsley, P. S., Clark, E. A., & Ledbetter, J. A.: T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 5031-5035 (1990)

72 Lyford-Pike, S., Peng, S., Young, G. D., Taube, J. M., Westra, W. H., Akpeng, B., Pai, S. I.: Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research*. 73: 1733-1741 (2013)

73 Tabachnyk M., Distel, L.V.R., Buttner, M., Grabenbauer, G. G., Nkenke E., Fietkau R., Lubgan D.: Radiochemotherapy induces a favourable tumour infiltrating inflammatory cell profile in head and neck cancer. *Oral Oncology*. 48: 594-601 (2012)

74 Manukian, G., Bar-Ad, V., Lu, B., Argiris, A., & Johnson, J. M.: Combining radiation and immune checkpoint blockade in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Frontiers in Oncology*. 9: 122 (2019)

75 Manzo, T., Heslop, H. E., & Rooney, C. M. Antigen-specific T cell therapies for cancer. *Human Molecular Genetics*. 15: 67-73 (2015)

76 Mapara, M. Y., & Sykes, M.: Tolerance and cancer: Mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *Journal of Clinical Oncology*. 22: 1136-1151 (2004)

77 Martinez, J. C., Otley, C. C., Okuno, S. H., Foote, R. L., & Kasperbauer, J. L.:

Chemotherapy in the Management of Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Organ Transplant Recipients: Theoretical and Practical Considerations. *Dermatologic Surgery*.30: 679-686 (2004)

78 Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H., & Forastiere, A. A.: HPV-associated head and neck cancer: A virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology*. 11: 781-789 (2010)

79 Marur, S., & Forastiere, A. A.: Head and neck cancer: Changing epidemiology, diagnosis, and treatment. In *Mayo Clinic Proceedings*. 83: 489-501 (2008)

80 Marx, R. E., & Ames, J. R.: The use of hyperbaric oxygen therapy in bony reconstruction of the irradiated and tissue-deficient patient. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.40: 412-420 (1982)

81 Mehrotra, R., & Yadav, S.: Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian Journal of Cancer*. 43: 60-66 (2009)

82 Meier, R., Beckman, A., Henning, G., Mohideen, N., Woodhouse, S. A., Cotrutz, C., & Kaplan, I. D.: Five-Year Outcomes From a Multicenter Trial of Stereotactic Body Radiation Therapy for Low- and Intermediate-Risk Prostate Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. 96: 33-34 (2016)

83 Miller, S. H., & Rudolph, R.: Healing in the irradiated wound. *Clinics in Plastic Surgery*. 17: 503-508 (1990)

84 Mino-Kenudson, M.: Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression by immunohistochemistry: could it be predictive and/or prognostic in non-small cell lung cancer? *Cancer Biology and Medicine*. 13: 157-170 (2016)

85 Moreau, P., Robillard, N., Jégo, G., Pellat, C., Gouill, S. Le, Thoumi, S., Bataille, R.: Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. *British Journal of Haematology*. 132: 168-170 (2006)

86 Morgan, T. K., Zhao, S., Chang, K. L., Haddix, T. L., Domanay, E., Cornbleet, P. J., Natkunam, Y.: Low CD27 expression in plasma cell dyscrasias correlates with high-risk disease: An immunohistochemical analysis. *American Journal of Clinical Pathology*. 126: 545-551 (2006)

87 Muenst, S., Läubli, H., Soysal, S. D., Zippelius, A., Tzankov, A., & Hoeller, S.: The immune system and cancer evasion strategies: Therapeutic concepts. *Journal of Internal Medicine*. 279: 541-562 (2016)

88 Neville, B. W., & Day, T. A.: Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA: A*

Cancer Journal for Clinicians. 52: 195-215 (2002)

89 Newman, J. R., Connolly, T. M., Illing, E. A., Kilgore, M. L., Locher, J. L., & Carroll, W. R.: Survival trends in hypopharyngeal cancer: A population-based review. *Laryngoscope*. 125: 624-629 (2015)

90 O'Donnell, J. S., Smyth, M. J., & Teng, M. W. L.: PD1 functions by inhibiting CD28-mediated co-stimulation. *Clinical and Translational Immunology*. 6: 138 (2017)

91 Ock, C. Y., Kim, S., Keam, B., Kim, S., Ahn, Y. O., Chung, E. J., Heo, D. S.: Changes in programmed death-ligand 1 expression during cisplatin treatment in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 8: 97920-97927 (2017)

92 Ohigashi, Y., Sho, M., Yamada, Y., Tsurui, Y., Hamada, K., Ikeda, N., Nakajima, Y.: Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clinical Cancer Research*. 11: 2947-2953 (2005)

93 Ohlwein, S., Kruse, E., Kiese-Himmel, C., & Steiner, W.: Stimmfunktion und lebensqualitat - Patienten mit larynxkarzinom nach minimal-invasiver laserchirurgie und "funktionaler stimmrehabilitation"Voice function and quality of life - Patients with laryngeal carcinoma following minimal-invasive laser surgery and. *Laryngo- Rhino- Otologie*. 84: 253-260 (2005)

94 Oosterhoff, D., Heusinkveld, M., Lougheed, S. M., Kosten, I., Lindstedt, M., Bruijns, S. C. M., de Gruijl, T. D.: Intradermal Delivery of TLR Agonists in a Human Explant Skin Model: Preferential Activation of Migratory Dendritic Cells by Polyribosinic-Polyribocytidylic Acid and Peptidoglycans. *The Journal of Immunology*. 190: 3338-3345 (2013)

95 Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M. C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., & Fridman, W. H.: Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 48: 594-601 (2010)

96 Pantel, M., & Guntinas-Lichius, O.: Larynxkarzinom: Epidemiologie, Risikofaktoren und Überleben. *HNO*. 60: 32-40 (2012)

97 Pardoll, D. M.: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 12: 252-264 (2012)

98 Parikh, F., Duluc, D., Imai, N., Clark, A., Misiukiewicz, K., Bonomi, M., Sikora, A. G.: Chemoradiotherapy-induced upregulation of PD-1 antagonizes immunity

to HPV-related oropharyngeal cancer. *Cancer Research*. 74: 7205-7216 (2014)

99 Pauken, K. E., Sammons, M. A., Odorizzi, P. M., Manne, S., Godec, J., Khan, O., Wherry, E. J.: Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science*. 354: 1160-1165 (2016)

100 Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J., & Allison, J. P.: Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *Journal of Experimental Medicine*. 206: 1717-1725 (2009)

101 Peller, M., Katalinic A., Wollenberg B., U Teudt I. U., Meyer J. E., *Epidemiology of laryngeal carcinoma in Germany, 1998-2011. Eur Arch Otorhinolaryngol*. 273: 1481-1487 (2016)

102 Pignon J-P., le Maitre A., Maillard E., Bourhis J., Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17, 346 patients Radiotherapy and Oncology. 92: 4-14 (2009)

103 Philouze, P., Céruse, P., & Thariat, J.: Surgery or radiotherapy for oropharyngeal HPV-positive tumours? *Cancer/Radiotherapie*. 22: 481-486 (2018)

104 Posner, M. R.: Paradigm Shift in the Treatment of Head and Neck Cancer: The Role of Neoadjuvant Chemotherapy. *The Oncologist*. 10: 11-19 (2005)

105 Ramakrishna, V., Sundarapandiyan, K., Zhao, B., Bylesjo, M., Marsh, H. C., & Keler, T.: Characterization of the human T cell response to in vitro CD27 costimulation with varlilumab. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 3: 37 (2015)

106 Ribas, A., Hamid, O., Daud, A., Hodi, F. S., Wolchok, J. D., Kefford, R., Robert, C.: Association of pembrolizumab with tumor response and survival among patients with advanced melanoma. In *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 315: 1600-1609 (2016)

107 Roberts, D. J., Franklin, N. A., Kingeter, L. M., Yagita, H., Tutt, A. L., Glennie, M. J., & Bullock, T. N. J.: Control of established melanoma by cd27 stimulation is associated with enhanced effector function and persistence, and reduced PD-1 expression of tumor infiltrating CD8+ T cells. *Journal of Immunotherapy*. 33: 769-779 (2010)

108 Sadahiro, S., Suzuki, T., Maeda, Y., Tanaka, A., Kamijo, A., Murayama, C.,

Akiba, T.: Effects of preoperative immunochemoradiotherapy and chemoradiotherapy on immune responses in patients with rectal adenocarcinoma. *Anticancer Research*. 30: 993-1000 (2010)

109 Santos, R. C. S., Dias, R. S., Giordani, A. J., Segreto, R. A., & Segreto, H. R. C.: Mucositis in head and neck cancer patients undergoing radiochemotherapy. *Revista Da Escola de Enfermagem*. 45: 1338-1344 (2011)

110 Sarkar, S., Mehta, S. A., Tiwari, J., Mehta, A. R., & Mehta, M. S.: Complications following surgery for cancer of the larynx and pyriform fossa. *Journal of Surgical Oncology*. 43: 245-249 (1990)

111 Savage, P. A., Leventhal, D. S., & Malchow, S.: Shaping the repertoire of tumor-infiltrating effector and regulatory T cells. *Immunological Reviews.*259: 245-258 (2014)

112 Schneider, S., Kadletz, L., Wiebringhaus, R., Kenner, L., Selzer, E., Füreder, T., Rajky, O., Berghoff, A. S., Preusser, M., Heiduschka, G.: PD-1 and PD-L1 expression in HNSCC primary cancer and related lymph node metastasis – impact on clinical outcome. Histopathology 73: 573-584 (2018)

113 Schoppy, D. W., & Sunwoo, J. B.: Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 29: 1033-1043 (2015)

114 Schrank, M.: Staging von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches Nachweis von synchronen Zweittumoren mit 18 F-FDG-PET / CT. Med Dissertation, Technischen Universität München (2013)

115 Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J.: Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 331: 1565-1570 (2011)

116 Schuler, P. J., Harasymczuk, M., Schilling, B., Saze, Z., Strauss, L., Lang, S., Whiteside, T. L.: Effects of adjuvant chemoradiotherapy on the frequency and function of Regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Clinical Cancer Research*. 19: 6585-6596 (2013)

117 Schuler, P. J., Laban, S., Doescher, J., Bullinger, L., & Hoffmann, T. K.: Novel Treatment Options in Head and Neck Cancer. *Oncology Research and Treatment*. 40: 342-346 (2017)

118 Schumacher, T. N., & Schreiber, R. D.: Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 348: 69-74 (2015)

119 Scully, C., & Bagan, J.: Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncology*. 45: 301-308 (2009)

120 Sethi, S., Lu, M., Kapke, A., Benninger, M. S., Worsham, M. J.: Patient and Tumor Factor at Diagnosis in a Multi-Ethnic Primary Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cohort. J Surg Oncol. 99: 2 (2009)

121 Sessions, D. G., Spector, G. J., Lenox, J., Parriott, S., Haughey, B., Chao, C., Perez, C.: Analysis of treatment results for floor-of-mouth cancer. *Laryngoscope*. 110: 1764-1772 (2000)

122 Sheng, J., Fang, W., Yu, J., Chen, N., Zhan, J., Ma, Y., Zhang, L.: Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*. 6: 23850 (2016)

123 Shimoji, M., Shimizu, S., Sato, K., Suda, K., Kobayashi, Y., Tomizawa, K., Mitsudomi, T.: Clinical and pathologic features of lung cancer expressing programmed cell death ligand 1 (PD-L1). *Lung Cancer*. 98: 69-75 (2016)

124 Shin, D. M., & Khuri, F. R.: Advances in the management of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head and Neck*. 35: 443-453 (2013)

125 Shin, T., Yoshimura, K., Shin, T., Crafton, E. B., Tsuchiya, H., Housseau, F., … Pardoll, D. M.: In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *Journal of Experimental Medicine*. 201: 1531-1541 (2005)

126 Smith, J., Robida, M. D., Acosta, K., Vennapusa, B., Mistry, A., Martin, G., Hnatyszyn, H. J.: Quantitative and qualitative characterization of Two PD-L1 clones: SP263 and E1L3N. *Diagnostic Pathology*. 11: 44 (2016)

127 Sridharan, V., Margalit, D. N., Lynch, S. A., Severgnini, M., Zhou, J., Chau, N. G., Schoenfeld, J. D.: Definitive chemoradiation alters the immunologic landscape and immune checkpoints in head and neck cancer. *British Journal of Cancer*. 115: 252-260 (2016)

128 Srivastava, R. M., Lee, S. C., Andrade Filho, P. A., Lord, C. A., Jie, H. B., Davidson, H. C., Ferris, R. L.: Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 19:1858-1872 (2013)

129 Sturgis, E. M., & Cinciripini, P. M.: Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: An emerging epidemic of human

papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 110: 1429-1435 (2007)

130 Sugita, K., Robertson, M. J., Torimoto, Y., Ritz, J., Schlossman, S. F., & Morimoto, C.: Participation of the CD27 antigen in the regulation of IL-2-activated human natural killer cells. *Journal of Immunology*. 149: 1199-1203 (1992)

131 Tabachnyk, M., Distel, L. V. R., Büttner, M., Grabenbauer, G. G., Nkenke, E., Fietkau, R., & Lubgan, D.: Radiochemotherapy induces a favourable tumour infiltrating inflammatory cell profile in head and neck cancer. *Oral Oncology*. 48: 594-601 (2012)

132 Takeda, K., Oshima, H., Hayakawa, Y., Akiba, H., Atsuta, M., Kobata, T., Okumura, K.: CD27-Mediated Activation of Murine NK Cells. *The Journal of Immunology*. 164: 1741-1745 (2000)

133 Thompson, R. H., Kuntz, S. M., Leibovich, B. C., Dong, H., Lohse, C. M., Webster, W. S., Kwon, E. D.: Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Research*. 66: 3381-3385 (2006)

134 Timmerman, R., Paulus, R., Galvin, J., Michalski, J., Straube, W., Bradley, J., Choy, H.: Stereotactic body radiation therapy for inoperable early stage lung cancer. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 303: 1070-1076 (2010)

135 Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M.: Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*. 24: 207-212 (2012)

136 Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Sznol, M.: Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *New England Journal of Medicine*. 28: 2443-2454 (2012)

137 Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A.: Global cancer statistics,2012. CA: A. *Cancer Journal for Clinicians*. 25: 180-184 (2015)

138 Tseng, S. Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J. E., Pai, S. I., Tsuchiya, H.: B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 193: 839-845 (2001)

139 Turaj, A. H., Hussain, K., Cox, K. L., Rose-Zerilli, M. J. J., Testa, J., Dahal, L. N., Lim, S. H.: Antibody Tumor Targeting Is Enhanced by CD27 Agonists

through Myeloid Recruitment. *Cancer Cell*. 32: 777-791 (2017)

140 Van den Bogaert, W., Ostyn, F., Lemkens, P., & van der Schueren, E.: Are postoperative complications more frequent and more serious after irradiation for laryngeal and hypopharyngeal cancer? *Radiotherapy and Oncology*. 2: 31-36 (1984)

141 van Lier, R. A., Borst, J., Vroom, T. M., Klein, H., Van Mourik, P., Zeijlemaker, W. P., & Melief, C. J.: Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27), a novel T cell differentiation antigen. *Journal of Immunology*. 139: 1589-1596 (1987)

142 van Meir, H., Nout, R. A., Welters, M. J. P., Loof, N. M., de Kam, M. L., van Ham, J. J., van der Burg, S. H.: Impact of (chemo)radiotherapy on immune cell composition and function in cervical cancer patients. *OncoImmunology*. 6: 2 (2017)

143 Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Hitt, R.: Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*. 359: 1116-1127 (2008)

144 Vitale, L. A., He, L. Z., Thomas, L. J., Widger, J., Weidlick, J., Crocker, A., Keler, T.: Development of a human monoclonal antibody for potential therapy of CD27-expressing lymphoma and leukemia. *Clinical Cancer Research*. 18: 3812-3821 (2012)

145 Vossen, M. T. M., Matmati, M., Hertoghs, K. M. L., Baars, P. A., Gent, M.-R., Leclercq, G., van Lier, R. A. W.: CD27 Defines Phenotypically and Functionally Different Human NK Cell Subsets. *The Journal of Immunology*. 180: 3739-3745 (2008)

146 Weber, R. S., Berkey, B. A., Forastiere, A., Cooper, J., Maor, M., Goepfert, H., Ensley, J.: Outcome of Salvage Total Laryngectomy Following Organ Preservation Therapy. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 129: 44-49 (2003)

147 Welsch U., Deller T.: Schneiden In: *Lehrbuch Histologie* (3rd ed.). Münschen: Urban&Fischer S. 4 (2010)

148 Welsch U., Deller T.: Immunhistochemie In: *Lehrbuch Histologie* (3rd ed.). Münschen: Urban&Fischer S. 5-6 (2010)

149 Wherry, E. J., & Kurachi, M.: Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*. 15: 486-499 (2015)

150 Wilke, C. M., Wei, S., Wang, L., Kryczek, I., Kao, J., & Zou, W.: Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon-γ. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 60: 1529-1541 (2011)

151 Wittekind, C.: TNM: Klinische Klassifikation. In: *TNM Klassifikation Maligner Tumoren 8. Auflage.* (8th ed.). Leipzig: Wiley-VCH. S.7 (2017)

152 Wittekind, C.: TNM: Klinische Klassifikation. In: *TNM Klassifikation Maligner Tumoren 8. Auflage.* (8th ed.). Leipzig: Wiley-VCH. S. 8 (2017)

153 Wittekind, C.: Stadien und prognostische Gruppeneinteilung. In: *TNM Klassifikation Maligner Tumoren 8. Auflage.* (8th ed.). Leipzig: Wiley-VCH. S. 16-20 (2017)

154 Wittekind, C.: Beispiel für das UICC-Prognosefaktoren-Gitter- In: *TNM Klassifikation Maligner Tumoren 8. Auflage.* (8th ed.). Leipzig: Wiley-VCH. S. 19 (2017)

155 Wittekind, C.: Lippen und Mundhöhle, Anatomische Bezirke und Unterbezirke In: *TNM Klassifikation Maligner Tumoren 8. Auflage.* (8th ed.). Leipzig: Wiley-VCH. S. 25 (2017)

156 Wittekind, C.: Pharynx, Anatomische Bezirke und Unterbezirke In: *TNM Klassifikation Maligner Tumoren 8. Auflage.* (8th ed.). Leipzig: Wiley-VCH. S. 29-30 (2017)

157 Wittekind, C.: Pharynx, Anatomische Bezirke und Unterbezirke In: *TNM Klassifikation Maligner Tumoren 8. Auflage.* (8th ed.). Leipzig: Wiley-VCH. S. 29 (2017)

158 Wolff, K.-D., Follmann, M., & Nast, A.: The Diagnosis and Treatment of Oral Cavity Cancer. *Deutsches Aerzteblatt Online*. 109: 829-835 (2012)

159 Wu, C., Zhu, Y., Jiang, J., Zhao, J., Zhang, X. G., & Xu, N.: Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochemica*. 108: 19-24 (2006)

160 Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I., Patil, S., & Misra, A.: Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. *Biomaterials*. 34:8690- 8707 (2013)

161 Zandberg, D. P., & Strome, S. E.: The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology*. 50: 627-632 (2014)

162 Zaretsky, J. M., Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., Ribas, A.: Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *New England Journal of Medicine*. 375: 819-829 (2016)

163 Zhang, P., Ma, Y., Lv, C., Huang, M., Li, M., Dong, B., … Yang, Y.: Upregulation of programmed cell death ligand 1 promotes resistance response in non-small-cell lung cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy. *Cancer Science*. 107: 1563-1571 (2016)

7 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 DIE AKTIVIERUNG SPEZIFISCHER T-ZELLEN WIRD ENTWEDER DURCH ANTIGEN-PRÄSENTIERENDE ZELLEN ÜBER MHC-II ODER DURCH TUMORZELLEN ÜBER MHC-I INDUZIERT. EIN CO-STIMULIERENDES SIGNAL, Z.B. CD28 UND EIN AKTIVIERENDES CYTOKIN-MILIEU SIND EBENFALLS ERFORDERLICH. DIE T-ZELL-AKTIVIERUNG KANN DURCH EINE VIELZAHL VON CHECKPOINT-MOLEKÜLEN REGULIERT WERDEN, Z. CTLA-4, PD-1, OX-40 UND CD27. 16
ABBILDUNG 2 CD27 INTENSITÄT 1 (*1 STROMA *2TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, CD27 CLUSTER OF DIFFERENTIATION 27) 31
ABBILDUNG 3 CD27 INTENSITÄT 2 (*1 STROMA *2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, CD27 CLUSTER OF DIFFERENTIATION 27) 31
ABBILDUNG 4 CD27 INTENSITÄT 3 (*1 STROMA *2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, CD27 CLUSTER OF DIFFERENTIATION 27) 32
ABBILDUNG 5 PD-L1 TUMOR INTENSITÄT 0 (*1 STROMA *2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1) 33
ABBILDUNG 6 PD-L1 TUMOR INTENSITÄT 1 (*1 STROMA *2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1) 33
ABBILDUNG 7 PD-L1 TUMOR INTENSITÄT 2 (*1 STROMA *2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1) 34
ABBILDUNG 8 PD-L1 TUMOR INTENSITÄT 3 (*2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1) 34
ABBILDUNG 9 PD-L1 STROMA INTENSITÄT 0 (*1 STROMA), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1) 35
ABBILDUNG 10 PD-L1 STROMA INTENSITÄT 1 (*1 STROMA), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1) 35
ABBILDUNG 11 PD-L1 STROMA INTENSITÄT 2 (*1 STROMA *2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1) 36
ABBILDUNG 12 PD-L1 STROMA INTENSITÄT 3 (*1 STROMA *2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1) 36
ABBILDUNG 13 PD-1 TUMOR INTENSITÄT 0 (*1 STROMA *2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1) 37
ABBILDUNG 14 PD-1 TUMOR INTENSITÄT 1 (*1 STROMA *2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1) 37
ABBILDUNG 15 PD-1 TUMOR INTENSITÄT 2 (*1 STROMA *2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1) 38
ABBILDUNG 16 PD-1 STROMA INTENSITÄT 0 (*1 STROMA), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1) 38
ABBILDUNG 17 PD-1 STROMA INTENSITÄT 1 (*1 STROMA *2 TUMOR), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-

2016, PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1)....39
ABBILDUNG 18 PD-1 STROMA INTENSITÄT 2 (*1 STROMA), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1)....39
ABBILDUNG 19 PD-1 STROMA INTENSITÄT 3 (*1 STROMA), (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1)....39
ABBILDUNG 20: KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER CD27 EXPRESSION AUF IMMUNZELLEN DES STROMAS BZGL. DES GESAMTÜBERLEBENS, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016 (CD27 CLUSTER OF DIFFERENTIATION)....48
ABBILDUNG 21 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-L1 EXPRESSION AUF IMMUNZELLEN DES STROMAS BZGL. DES GESAMTÜBERLEBENS, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1)....48
ABBILDUNG 22 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-L1 EXPRESSION AUF TUMORZELLEN BZGL. DES GESAMTÜBERLEBENS, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1)....49
ABBILDUNG 23 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-1 EXPRESSION AUF IMMUNZELLEN DES STROMAS BZGL. DES GESAMTÜBERLEBENS, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1)....49
ABBILDUNG 24 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-1 EXPRESSION AUF TUMORZELLEN BZGL. DES GESAMTÜBERLEBENS, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1)....50
ABBILDUNG 25: KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER CD27 EXPRESSION AUF IMMUNZELLEN DES STROMAS BZGL. DES KRANKHEITSFREIEN ÜBERLEBENS VOR RADIOCHEMOTHERAPIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (CD27 CLUSTER OF DIFFERENTIATION 27)....54
ABBILDUNG 26 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER CD27 EXPRESSION AUF IMMUNZELLEN DES STROMAS BZGL. DES KRANKHEITSFREIEN ÜBERLEBENS NACH RADIOCHEMOTHERAPIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (CD27 CLUSTER OF DIFFERENTIATION 27)....54
ABBILDUNG 27 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-L1 EXPRESSION AUF TUMORZELLEN BZGL. DES KRANKHEITSFREIEN ÜBERLEBENS VOR RADIOCHEMOTHERAPIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1)....55
ABBILDUNG 28 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-L1 EXPRESSION AUF TUMORZELLEN BZGL. DES KRANKHEITSFREIEN ÜBERLEBENS NACH RADIOCHEMOTHERAPIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1)....55
ABBILDUNG 29 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-L1 EXPRESSION AUF IMMUNZELLEN DES STROMAS BZGL. DES KRANKHEITSFREIEN ÜBERLEBENS VOR RADIOCHEMOTHERAPIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1)....56
ABBILDUNG 30 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-L1 EXPRESSION AUF

IMMUNZELLEN DES STROMAS BZGL. DES KRANKHEITSFREIEN ÜBERLEBENS NACH RADIOCHEMOTHERAPIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-L1 PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1) 56
ABBILDUNG 31 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-1 EXPRESSION AUF TUMORZELLEN BZGL. DES KRANKHEITSFREIEN ÜBERLEBENS VOR RADIOCHEMOTHERAPIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1) 57
ABBILDUNG 32 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-1 EXPRESSION AUF TUMORZELLEN BZGL. DES KRANKHEITSFREIEN ÜBERLEBENS NACH RADIOCHEMOTHERAPIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1) 57
ABBILDUNG 33 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-1 EXPRESSION AUF IMMUNZELLEN DES STROMAS BZGL. DES KRANKHEITSFREIEN ÜBERLEBENS VOR RADIOCHEMOTHERAPIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1) 58
ABBILDUNG 34 KAPLAN-MEIER-KURVE: PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER PD-1 EXPRESSION AUF IMMUNZELLEN DES STROMAS BZGL. DES KRANKHEITSFREIEN ÜBERLEBENS NACH RADIOCHEMOTHERAPIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016, (PD-1 PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1) 58

8 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: BEURTEILUNG DES PRIMÄRTUMORS, TNM-KLASSIFIKATION NACH WITTEKIND (WITTEKIND, 2017) 7
TABELLE 2: BEURTEILUNG DER LYMPHKNOTEN, TNM-KLASSIFIKATION NACH WITTEKIND (WITTEKIND, 2017) 8
TABELLE 3: BEURTEILUNG DER FERNMETASTASEN, TNM-KLASSIFIKATION NACH WITTEKIND (WITTEKIND, 2017) 8
TABELLE 4: PROGNOSEFAKTOREN (WITTEKIND, 2017) 15
TABELLE 5: AUFLISTUNG DER VERBRAUCHSMATERIALIEN MIT HERSTELLER, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016 28
TABELLE 6: ELEKTRONISCHE DATENVERARBEITUNG, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016 29
TABELLE 7: CHARAKTERISIERUNG DER PATIENTENKOHORTE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016 41
TABELLE 8: GEPAARTER T-TEST (EXPRESSIONSSTATUS PD-L1, PD-1, CD27 VOR U. NACH RCT) UNGEPAARTER T-TEST (EXPRESSIONSSTATUS VON PD-L1, PD-1, CD27 BEZGL. THERAPIEANSPRECHER BIOPSIE NEGATIV/POSITIV), UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016 44
TABELLE 9: EXPRESSIONSSTATUS VOR UND NACH RADIOCHEMOTHERAPIE STRATIFIZIERT NACH THERAPIEANSPRECHEN, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016 45
TABELLE 10: KRUSKAL-WALLIS-TEST EINFLUSS THERAPEUTIKA AUF EXPRESSION, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016 46
TABELLE 11: 5-JAHRES-ÜBERLEBEN HINSICHTLICH DES EXPRESSIONSSTATUS, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016 47
TABELLE 12: CHI^2-TEST REZIDIV IN VERBINDUNG MIT DER EXPRESSION, UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016 51
TABELLE 13: KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN LOG-RANK (POSITIVER CUT-OFF FÜR CD27 ≥ 5, POSITIVER CUT-OFF FÜR PD-L1 UND PD-1 ≥ 1), UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2005-2016 53

9 Lebenslauf

Peter Minkenberg

Personalien

Geburtsjahr:	**1991**
Geburtsort:	Heinsberg
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Universitärer Werdegang

27.05.2019	Zahnmedizinisches Staatsexamen Universität Ulm (Note: gut)
04.03.2016	Zahnärztliche Vorprüfung an der Universität Ulm
SS 2014	Wechsel an die Universität Ulm
WS 2012/13	Zahnmedizin Studium an der Universität Pécs (Ungarn)

Schulischer Werdegang

01.10. 2011-30.09.2012:	Bundesfreiwilligendienst an der Rurtal-Schule Oberbruch (Förderschule mit dem Förderschwerpunkt Geistige Entwicklung)
2011:	Abitur (Note: 2,2)
2008-2011:	Betty-Reis-Gesamtschule, Wassenberg
2002 bis 2008:	Städtische Realschule Oberbruch Fachoberschulreife (Mittlere Reife)
1998 bis 2002:	Pestalozzi-Grundschule Oberbruch

Teilnahme an Fortbildungsveranstaltungen

Zertifikat über Kariesmanagement durch Kariesinfiltration (ICON) November 2018

Zertifikat über BWL in Praxis für Zahnmediziner WS 2017/2018

Publikationen

2020: Immune checkpoint expression in HNSCC patients before and after definitive chemoradiotherapy.
Doescher J., Minkenberg P., Laban S., Kostezka U., von Witzleben A., Hoffmann T. K., Schuler P. J., Weissinger S. E.,
Head Neck

Mitgliedschaften

Landeszahnärztekammer Nordrhein