

Aus dem Bereich  
Klinische Medizin - Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Analyse der Immunzellinfiltration des Tumormikromilieus und seiner prognostischen  
Relevanz bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2023

vorgelegt von: Moritz Knebel  
geb. am 22.06.1996 in Speyer/Deutschland

*Für meine Familie.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Plattenepithelkarzinome des Kopf Hals Bereichs (HNSCCs)</b> .....	<b>4</b>
2.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese.....	4
2.1.2	Diagnostik, Therapie und Prognose.....	8
<b>2.2</b>	<b>Immunologisches Tumor microenvironment von Kopf-Hals Karzinomen</b> .....	<b>11</b>
2.2.1	Humanes Immunsystem .....	11
2.2.2	Einfluss des Immunsystems auf das Tumormikromilieu von Kopf-Hals Karzinomen .	14
2.2.2.1	<i>Naive B Zellen</i> .....	15
2.2.2.2	<i>Lymphozyten</i> .....	16
2.2.2.3	<i>Zytotoxische T-Zellen (CD8+ Zellen)</i> .....	17
2.2.2.4	<i>Makrophagen</i> .....	18
2.2.2.5	<i>Follikuläre T-Helfer Zellen</i> .....	19
2.2.2.6	<i>Regulatorische T-Zellen (Treg)</i> .....	19
<b>2.3</b>	<b>„The Cancer Genome Atlas “(TCGA)</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Fragestellung dieser Arbeit</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>24</b>
3.1.1	Patientenmaterial .....	24
3.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	24
3.1.3	Chemikalien.....	25
3.1.4	Primärantikörper.....	26
3.1.5	Sekundärantikörper.....	26
<b>3.2</b>	<b>Immunhistochemie</b> .....	<b>26</b>
3.2.1	Gewebepräparation und Fixierung .....	27
3.2.2	Versuche zur Etablierung der Standardfärbeprotokolle .....	28
3.2.3	Allgemeiner Versuchsablauf der immunhistochemischen Färbungen .....	30
3.2.3.1	<i>Versuchsablauf der Einzelfärbung (CD4, CD20, CXCR5)</i> .....	30
3.2.3.2	<i>Versuchsablauf der Doppelfärbung (CD20+CXCR5; CD4+CXCR5)</i> .....	31

3.2.4	Semiquantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen .....	34
<b>3.3</b>	<b>Analyse der TCGA-Sequenzierungsdaten .....</b>	<b>36</b>
<b>3.4</b>	<b>Analyse der Immunhistochemie .....</b>	<b>37</b>
3.4.1	Patienten mit einem Vitamin D Mangel .....	37
3.4.2	Patienten mit ausreichender Vitamin D Versorgung .....	39
3.4.3	HPV-Status der UKS-Kohorte .....	40
<b>3.5</b>	<b>Statistische Analysen .....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Beschreibung der Patientenkollektive .....</b>	<b>42</b>
4.1.1	Histopathologische Charakteristika des UKS-Kollektivs.....	43
<b>4.2</b>	<b>Untersuchungen der TCGA-HNSC-Kohorte.....</b>	<b>44</b>
4.2.1	Prognostische Relevanz der Immunzellinfiltration und -aktivität innerhalb der TCGA-HNSC-Kohorte .....	44
4.2.2	Klinische und histopathologische Charakteristika der TCGA-HNSC-Kohorte und Korrelation mit der Immuninfiltration.....	50
4.2.3	Prognostische Relevanz des HPV-Tumorstatus in der TCGA-HNSC-Kohorte.....	52
<b>4.3</b>	<b>Immunhistochemische Analysen des Patientenkollektivs des UKS (Validierungskohorte) .....</b>	<b>52</b>
4.3.1	Prognostische Relevanz der Immunzellinfiltration und -aktivität innerhalb der UKS-Kohorte.....	53
4.3.2	Prognostische Relevanz klinischer Charakteristika innerhalb der UKS-Kohorte .....	58
4.3.3	Einfluss des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels auf die Immunzellinfiltration .....	60
4.3.4	Einfluss des HPV- Tumorstatus auf die Immunzellinfiltration .....	62
4.3.5	Einfluss des HPV-Tumorstatus auf den 25-OH-Vitamin D-Serumspiegel .....	64
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Quellenangaben .....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>91</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
° C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APC	antigenpräsentierende Zelle (antigen-presenting cell)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
CA	Karzinom
CCND1	Cyclin D1
CD	Cluster of Differentiation
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
CTL	zytotoxische T-Zellen
CYT Score	Cytolytic Activity Score
DNA	Desoxyribonucleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EDTA	Tetraethylendiaminoessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
et al.	und andere
ESTIMATE Score	Estimation of Stromal and Immune Cells in Malignant Tumor Tissues using Expression Data
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
g	Gramm
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	destilliertes Wasser
HE	Hämatoxylin/Eosin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HNSCC	Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (Head and neck squamous cell carcinoma)
HPV	Humanes Papillomavirus
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IRS	immunreaktiver Score
l	Liter
mg, mm, ml	Milligramm, Millimeter, Milliliter
MDSC	myeloide Supressorzellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
mRNA	„messenger“-Ribonucleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
µg, µm, µl, µM	Mikrogramm, Mikrometer, Mikroliter, Mikromolar
n	Stichprobenumfang
ng, nm, nl, nM	Nanogramm, Nanometer, Nanoliter
NSCLC	Non-Small-Cell Lung Cancer
OPSCC	oropharyngeal squamous cell carcinoma
OS	overall survival
p	statistischer Signifikanzwert
PBS	phosphatgepufferte Standardisalzlösung
PFS	progression free survival
PCR	Polymerasekettenreaktion
Rb	Retinoblastomprotein
PET	Positronen-Emissions-Tomografie (PET)
RCT	Radiochemotherapie

RNA	Ribonukleinsäure
RNAseq Daten	RNA-Sequenzierungsdaten
RT	Raumtemperatur
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-ionenkonzentration
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde(n)
ssGSEA	Single-Sample Gene Set Enrichment Analysis
srRNAseq	short read RNA-Sequenzierungsdaten
UICC	Union for International Cancer Control
TAM	tumorassoziierten Makrophagen
TBS-T	TBS-Tween 20
TCGA-Atlas	The Cancer Genome Atlas
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-Cell-Receptor)
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TME	Tumormikroenvironment
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	regulatorische T-Zellen
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
UV	Ultraviolettes Licht
VEGF	vascular endothelial growth factor
WES	whole exome sequencing
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## 1 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) stellen mit jährlich 550.000 neu diagnostizierten Erkrankungen und 380.000 Todesfällen im Jahr die sechs häufigste Krebserkrankung der Welt dar. Trotz intensiver Bemühungen konnte die 5 Jahres-Überlebensrate mit circa 55% in den letzten Jahrzehnten nicht wesentlich verbessert werden. Vor dem Hintergrund einer wachsenden Bedeutung der Immuncheckpoint-Inhibition im Behandlungsspektrum von Kopf-Hals-Tumorpatienten gewinnen immunologische Prozesse im Tumormikroenvironment (TME) zunehmend an Bedeutung in der Kopf- und Hals-Onkologie. Trotz konstanter Verbesserung der Analysemethoden für umfassende Untersuchungen des immunologischen TMEs in den letzten Jahren bleibt die prognostische Relevanz der Zusammensetzung der Immunzellen im Tumormikromilieu von Kopf-Hals-Krebs weitgehend unklar. Ursache hierfür ist eine Begrenzung der meisten Studien auf eine oder eine kleine Untergruppe von Immunzellen und ein heterogenes Patientenkollektiv. In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wurden vor diesem Hintergrund 29 zelluläre und humorale Immun-Biomarker basierend auf RNA Sequenzierungs-Daten des TCGA-Projekts (The Cancer Genome Atlas) für Kopf-Hals-Tumorpatienten (TCGA-HNSC) untersucht. Zur Validierung wurden die sechs Zellpopulationen mit der höchsten prognostischen Relevanz an einem eigenen HNSCC-Patientenkollektiv validiert.

Das Gesamtüberleben (OS) der TCGA-HNSC Kohorte, die n=513 Kopf-Hals-Karzinom-Patienten umfasst, wurde in Abhängigkeit von 29 verschiedenen Immun-Biomarkern, darunter ein breites Spektrum von Immunzell-Subpopulationen sowie Immun-Checkpoint-Rezeptoren und Zytokine unter Verwendung eines RNAseq-Dekonvolutionsalgorithmus analysiert. Die signifikantesten Prädiktoren für das Überleben der 29 Immunparameter wurden an einer separaten HNSCC-Patientenkohorte (n=101) mittels Immunhistochemie semiquantitativ analysiert und mit dem Gesamtüberleben korreliert. Im Zuge der Validierung erfolgten die immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gerichtet gegen die Immunmarker CD3 (T-Zellen), CD20+CXCR5 (naive B-Zellen), CD4+CXCR5 (T-follikuläre Helferzellen), Foxp3 (Treg-Zellen) und CD68 (Makrophagen).

Die Gesamtimmunaktivität und -infiltration, gemessen durch den CYT- und ESTIMATE Immune Score zeigte unabhängig ihrer Zusammensetzung keine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Patienten in der TCGA-HNSC-Kohorte. Durch die Fokussierung auf einzelne Immunzell-Subpopulationen konnte ein gesteigerter Gehalt an naiven B-Zellen ( $p=0,0006$ ), follikulären T-Helferzellen ( $p<0,0001$ ), Makrophagen ( $p=0,0042$ ), regulatorischen T-Zellen ( $p=0,0306$ ), Lymphozyten ( $p=0,0001$ ) und zytotoxischen T-Zellen ( $p=0,0242$ ) im Tumormikroenvironment als hochsignifikante Prädiktoren für ein verbessertes Patientenüberleben identifiziert werden. Der immunhistochemische Nachweis dieser Immunzellen in einer zweiten unabhängigen Validierungskohorte von n=101 HNSCC-Patienten konnte diese prognostische Relevanz für follikuläre T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und Lymphozyten bestätigen. In einer Multivarianzanalyse konnten über die Immunzellpopulationen hinaus

ein negativer HPV-Tumorstatus, sowie fortgeschrittene UICC-Stadien als zusätzliche prognostische Biomarker identifiziert werden, die mit einem schlechten Outcome assoziiert waren. Die prognostischen Analysen konnten weiterhin eine Tendenz zu einem verbesserten Gesamtüberleben im Falle einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung der Patienten zeigen. Neben der prognostischen Bedeutsamkeit des HPV-Tumorstatus konnte eine signifikante Korrelation der HPV-Positivität mit einer verstärkten Immunzellinfiltration durch naive B-Zellen gezeigt werden.

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit unterstreicht somit die prognostische Relevanz des immunologischen Tumor microenvironment bei Kopf-Hals-Tumoren und zeigt, dass eine detaillierte Analyse der Immunzellzusammensetzung und der Immunzellsubtypen notwendig ist, um valide Rückschlüsse auf die Prognose der Patienten zu erhalten. Dabei zeigten Lymphozyten, zytotoxische T-Zellen und folliculäre T-Helferzellen auf der Grundlage unserer Daten die höchste prognostische Relevanz. Diese Ergebnisse motivieren zu weiteren Untersuchungen der spezifischen Immunzellsubpopulationen als Prädiktoren für die Prognose der betroffenen Patienten, sowie darüber hinaus als vielversprechende Ziele für neue immuntherapeutische Strategien.

## **Summary**

Dealing with 550,000 new diseases and 380,000 deaths per year head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer worldwide. Despite intensive efforts, the 5-year survival rate of approximately 55% has not been significantly improved in recent decades. Due to the increasing value of immune checkpoint inhibition in the therapeutic management of head and neck squamous cell carcinoma, immunological processes in the tumor microenvironment (TME) are increasingly gaining importance in the field of head and neck oncology. Though analytical methods for a comprehensive analysis of the immunological TME have constantly improved and expanded over the past years the prognostic relevance of immune cell composition in head and neck cancer TME largely remains ambiguous with most studies focusing on one or a small subset of immune cells and a heterogenous patient population. Therefore, in the present scientific work, 29 cellular and humoral immune biomarkers based on RNA sequencing data of the TCGA atlas were analyzed. For validation, the six cell populations with the highest prognostic relevance were validated in an own HNSCC patient collective.

The overall survival (OS) of the TCGA-HNSC patient cohort comprising 513 head and neck cancer patients was correlated with a total of 29 different immune metrics including a wide spectrum of immune cell subpopulations as well as immune checkpoint receptors and cytokines using RNAseq based immune deconvolution analyses. The most significant predictors of survival among these 29 immune metrics were validated on a separate HNSCC patient cohort (n=101) using immunohistochemistry. The immunohistochemical staining included antibodies against the immune marker: CD3 (T cells),



CD20+CXCR5 (naive B cells), CD4+CXCR5 (T follicular helper cells), Foxp3 (Treg cells), and CD68 (macrophages).

Overall immune infiltration irrespective of immune cell composition showed no significant correlation with the patients' overall survival in the TCGA-HNSC cohort. However, when focusing on different immune cell subpopulations, an increased level of naive B cells ( $p=0.0006$ ), follicular T-helper cells ( $p<0.0001$ ), macrophages ( $p=0.0042$ ), regulatory T cells ( $p=0.0306$ ), lymphocytes ( $p=0.0001$ ), and cytotoxic T cells ( $p=0.0242$ ) in the tumor microenvironment were identified as highly significant predictors of improved patient survival. Using immunohistochemical detection of these immune cells in a second independent validation cohort of  $n=101$  HNSCC patients could confirm prognostic relevance for follicular T helper cells, cytotoxic T cells and lymphocytes. In multivariate analysis, beyond immune cell populations, HPV negativity and advanced UICC stages were identified as additional prognostic biomarkers associated with poor outcome. The prognostic analyses could further show a tendency towards improved overall survival in case of sufficient vitamin D supply of the patient. In addition to the prognostic influence of HPV tumor status, HPV positivity could show a significant correlation to an increased immune cell infiltration of naive B cells.

Therefore, our study highlights the prognostic relevance of immunological tumor environment in head and neck cancer and demonstrates that a more detailed analysis of immune cell composition and immune cell subtypes is necessary to get valid conclusions on patient outcome. Thereby, lymphocytes, cytotoxic T cells, and follicular t helper cells showed the highest prognostic relevance based on our data, which motivates to further investigations focusing on these specific immune cell subpopulations not only as predictors of patient prognosis but also as promising targets of new immunotherapeutic strategies.

## 2 Einleitung

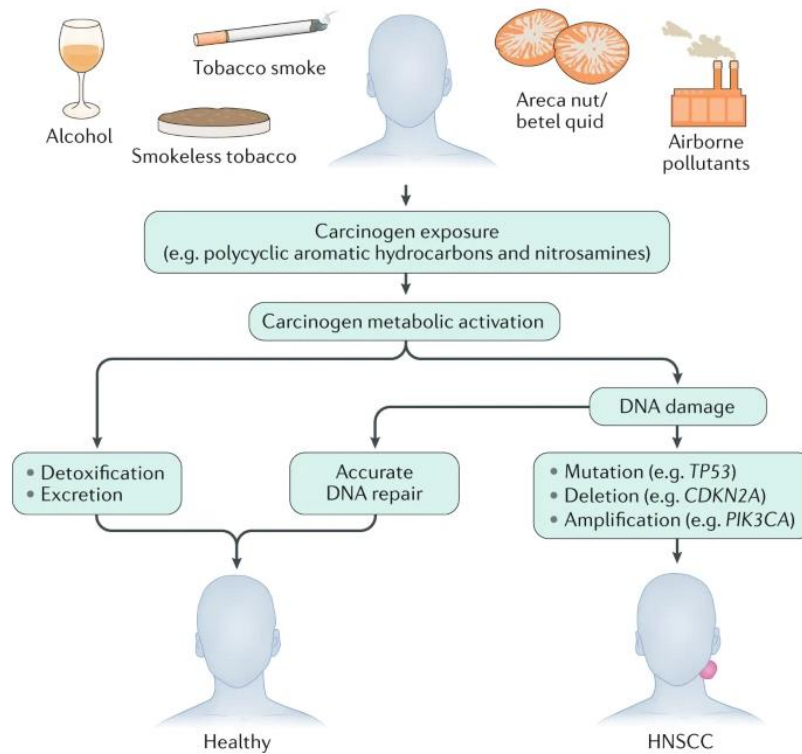
### 2.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf Hals Bereichs (HNSCCs)

Aufgrund zunehmender Fallzahlen und dauerhaft steigender Lebenserwartung werden Krebserkrankungen als häufigste Todesursache des 21. Jahrhunderts erwartet. Mit etwa 18,1 Millionen neuen Krebserkrankungen und daraus resultierenden 9,5 Millionen Todesfällen im Jahr 2018 kann diese Tendenz verdeutlicht werden (BRAY et al., 2018). Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs („head and neck squamous cell carcinoma“, HNSCC) stellen derzeit mit weltweit jährlich 550.000 neu diagnostizierten Patienten und 380.000 Toten im Jahr die sechs häufigste Krebserkrankung weltweit dar (FERLAY et al., 2010) (MCDERMOTT, BOWLES, 2019). Mit einem 2 bis 4fach höheren Risiko gegenüber Frauen sind vor allem Männer von HNSCCs betroffen (MCDERMOTT, BOWLES, 2019). Hauptrisikofaktoren für das Entstehen von HNSCCs stellen hierbei der chronischer Tabak- und/oder Alkoholkonsum, sowie eine Infektion der oralen/pharyngealen Schleimhaut mit „high risk“ Humanen Papillomviren (HR-HPV) der Genotypen 16 und 18 dar (SABATINI, CHIOCCA, 2020). Die Prognose der Patienten wird maßgeblich durch verschiedene klinische, molekulare sowie pathologische Faktoren wie dem Befall von Lymphknoten (ZÄTTERSTRÖM et al., 1991), dem Allgemeinzustand des Patienten (DE CÁSSIA BRAGA RIBEIRO et al., 2003), der Tumorlokalisation (SNOW et al., 1977), dem HPV-Tumorstatus (ANG et al., 2010), und dem UICC Stadium (POLANSKA et al., 2014) bestimmt. Zur zeitlichen Einordnung der Prognose in Form des 5-Jahres-Überlebens müssen die verschiedenen Subtypen der HNSCC Tumore, wie beispielsweise das Mundhöhlenkarzinom oder das Pharynxkarzinom, sowie das Vorhandensein der schon oben genannten Risikofaktoren berücksichtigt werden. Insgesamt liegt die 5-Jahres-Überlebensrate aller HNSCCs bei ca. 58 %, wobei signifikante Schwankungen zwischen den einzelnen Subtypen zu erkennen sind (63% für Oropharynxkarzinome, 59% für Larynxkarzinome, 54% für Mundhöhlenkarzinome, 33% für Hypopharynxkarzinome) (DU et al., 2019). Selbst ein erfolgreicher multimodaler Therapieansatz, der als Behandlungsmodalitäten bei der Mehrzahl der Patienten eine operative Therapie, Radiatio und/oder Radiochemotherapie (RCT) einschließt, konnte über die letzten Jahrzehnte nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Prognose von HNSCC-Patienten führen (JOHNSON et al., 2020). Mehr als 50 % der Patienten erleiden, selbst nach zunächst erfolgreicher Therapie, innerhalb von 5 Jahren nach Diagnose ein Rezidiv oder entwickeln Fernmetastasen (ECONOMOPOULOU et al., 2020). Vor diesem Hintergrund können, trotz noch geringer Ansprechraten von derzeit <25%, Immun-Checkpoint-Inhibitoren in Form von PD-1 Inhibitoren wie Pembrolizumab und Nivolumab als Meilenstein in der Therapie von HNSCCs angesehen werden (BURTNESS et al., 2019; COHEN et al., 2019; FERRIS et al., 2016).

#### 2.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals Region stellen die sechst häufigste Krebserkrankung weltweit dar. Aufgrund steigender Fallzahlen wird eine Zunahme der Inzidenz bis 2030 um bis zu 30% (circa 1,08 Millionen neue Fälle pro Jahr) erwartet (JOHNSON et al., 2020). In vielen Ländern zeigt sich mit

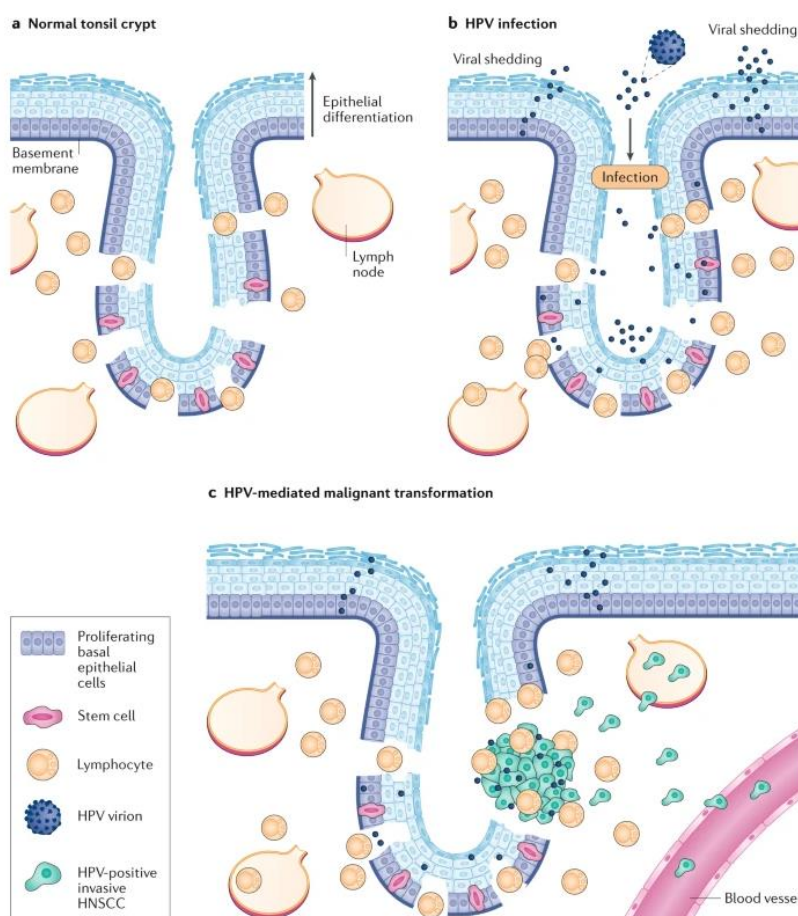
einem Verhältnis von 2:1 eine höhere Inzidenz- und Mortalitätsrate bei Männern (SUN et al., 2022). Ausgehend von unterschiedlichen Entstehungsmechanismen sind im globalen Kontext zudem deutliche geographische Unterschiede in der Prävalenz von HNSCCs zu erkennen (CHAMOLI et al., 2021). Hierbei tragen vor allem in Süd-Ost Asien und Australien der Konsum Karzinogen-enthaltender Produkte zu einer erhöhten Prävalenz bei, wohingegen in Europa und den Vereinigten Staaten steigende Raten an oropharyngealen HPV-Infektionen die hohe Prävalenz mitbedingen (JOHNSON et al., 2020; MEHANNA et al., 2013). Neben dem bereits erwähnten Alkohol- und Tabakkonsum gelten Infektionen der oropharyngealen Schleimhaut mit Humanem Papillomaviren als Hauptrisikofaktoren der HNSCCs. Weitere Risikofaktoren stellen eine schlechte Mundhygiene, nasopharyngeale Infektionen mit dem Epstein-Barr Virus, eine orale Infektion mit *Candida albicans* (ALNUAIMI et al., 2015), und in ostasiatischen Populationen vermehrt das Kauen der Betelnuss dar (AMTHA et al., 2014; SUN et al., 2022). Aufgrund des verbesserten Verständnisses der Krankheitsätiologie ist vor allem beim Oropharynkarzinom eine Einteilung in HPV-negative und HPV-positive Karzinome möglich und für das klinische Management dieser Patienten bedeutsam. Hierbei sind neben der unterschiedlichen Prognose, dem sozioökonomischen Profil und der klinischen Präsentation der Patienten auch die unterschiedlichen molekularen Profile der Tumoren dieser zwei Subgruppen zu beachten (LEEMANS et al., 2018; SEIWERT et al., 2015; SUN et al., 2022). Im Falle HPV-negativer Tumore beruht die Karzinogenese auf der Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen in Genen, deren kodierte Proteine in einer Vielzahl von Signalwegen wirken (siehe Abbildung 1). Diese Mutationen verursachen durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und die Überexpression von Proto-Onkogenen eine erhöhte Teilungsrate von Tumorzellen und eine Metastasierung, was zu den typischen krebsassoziierten Phänotypen führt (HANAHAN, WEINBERG, 2011; LEEMANS et al., 2018; SUN et al., 2022). Im Rahmen der Karzinogenese HPV-negativer HNSCCs kommt es in der Mehrzahl der Fälle zu Veränderungen des Transkriptionsfaktors p53, wodurch die Funktion zur Hemmung des Krebswachstums, zur Unterbrechung des Zellzyklus und zur Einleitung der Apoptose von Zellen gestört wird (SUN et al., 2022). Der Verlust von CDKN2A in Kombination mit der häufig beobachteten Amplifikation von Cyclin D1 (CCND1) sind weitere Modifikationen, die zur ungeplanten DNA-Replikation beitragen und so die Karzinogenese unterstützen (LEEMANS et al., 2018). Weitere Veränderungen können in der Angiogenese mit Mutationen des vascular endothelial growth factor (VEGF) und des epidermal growth factor receptor (EGFR) als Grundlage der unkontrollierten Zellvermehrung und Metastasierung von Kopf-Hals-Tumoren gefunden werden (VASSILAKOPOULOU et al., 2015).



**Abbildung 1: Entstehung karzinogen-assoziiertes, HPV-negativer HNSCCs.** Der Konsum der abgebildeten Risikofaktoren gilt als primärer Faktor zur Entstehung HPV-negativer Plattenepithelkarzinome der Kopf Hals Region. Vor allem Tabakrauch und die darin enthaltenen karzinogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe sowie Nitramine erhöhen das Risiko für die Entstehung von HNSCCs deutlich. Durch die metabolische Aktivierung und die Entstehung reaktiver Metabolite kommt es zu DNA-Schäden, die im Falle einer unvollständigen DNA-Reparatur zu Mutationen, Deletionen und Amplifikationen führen können. Die Akkumulation von Veränderungen in wichtigen Tumorsuppressorgenen, wie beispielsweise TP53, CDKN2A, oder in bestimmten Signalwegen wie dem mTOR Signalweg, sind mit dem Beginn, dem Progress sowie der schlechten Prognose HPV negativer HNSCCs assoziiert. (JOHNSON et al., 2020). (Abbildung aus (JOHNSON et al., 2020))

Trotz deutlichen geographischen Unterschieden, mit beispielsweise vergleichsweise hohem Anteil von HPV-assoziierten HNSCCs in Südamerika und Zentral-Ost- sowie Nordeuropa, ist ein allgemeiner Anstieg HPV positiver HNSCCs über die letzten Jahrzehnte zu beobachten (CASTELLSAGUÉ et al., 2016). Der Anteil HPV verursachter Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome stieg von 7,2% zwischen 1990 und 1994 auf 32,7% zwischen 2010 und 2012 (LEEMANS et al., 2018). Die Ursache hierfür sind wahrscheinlich in Veränderungen im Sexualverhalten der Bevölkerung zu suchen (D'SOUZA et al., 2007). HPV positive HNSCCs sind hauptsächlich im Oropharynx lokalisiert. Unter allen HPV-Subtypen verursacht der high-risk Subtyp HPV-16 mit 83% aller HPV assoziierten OPSCC („oropharyngeal squamous cell carcinoma“ OPSCC) die meisten OPSCCs (LEEMANS et al., 2018). Im Gegensatz zu HPV negativen HNSCCs basiert die Karzinogenese HPV positiver HNSCCs hauptsächlich auf genetischen Veränderungen durch die viralen Onkogene E6 und E7, die nach einer persistierenden Infektion mit einem high risk HPV-Subtyp, wie HPV16 oder HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59 und HPV68, eintreten können (POWELL et al., 2021; SABATINI, CHIOCCA, 2020). Nach Infektion der pharyngealen Schleimhaut und während der

Integration der HPV-DNA in das Wirtsgenom, kommt es häufig zu einem Abschneiden des negativen Regulators der frühen, viralen Genexpression E2, wodurch die transkriptionelle Unterdrückung der Onkogene E6 und E7 verhindert wird. (BERNARD et al., 1989; POWELL et al., 2021) Die Onkogene E6 und E7 führen über den Abbau von p53 und Rb Proteinen zur Umgehung von Zellzyklus-Checkpoints, was eine karzinogene Transformation der infizierten Schleimhaut induziert (SABATINI, CHIOCCA, 2020). Anzumerken ist jedoch, dass im Gegensatz zu HPV-negativen HNSCCs, bei denen TP53 (das für p53 kodiert) häufig deletiert oder mutiert ist, dieses Gen bei HPV-positiven HNSCCs selten verändert ist, da p53 durch die Wirkung von E6 deutlich vermindert exprimiert wird (JOHNSON et al., 2020). Veranschaulicht wird dieser Karzinogeneseprozess der HPV-assoziierten HNSCCs in Abbildung 2.



**Abbildung 2: HPV-Infektion von Epithelien in den Tonsillenkrypten und Entwicklung HPV-assoziiierter HNSCCs.**

(A) Tonsilleneithel in den Krypten an deren Basis besonders viele Stammzellen lokalisiert sind. Die Basalmembran ist durch diverse Lücken und Spalten gekennzeichnet durch die Lymphozyten in die Krypten eindringen und direkt mit fremden, externen Antigenen interagieren können. (B) Bei einer Infektion mit HPV ermöglicht die Beschaffenheit des Plattenepithels der Krypten dem Virus Zugang zu Stammzellen, proliferierenden Basalzellen und der Basalmembran. Infiltrierende Immunzellen kommen ebenfalls mit den Viruspartikeln in Kontakt. Im Falle einer produktiven Infektion werden verschiedene virale Gene und Proteine während der verschiedenen Stadien der Epithelzelldifferenzierung induziert und/oder aktiviert, was in der Produktion und Ausschüttung neuer Viruspartikel gipfelt. (C) Stammzellen oder proliferierende Basalzellen stellen Ursprungszellen für HPV-positive HNSCCs dar. Die stabile Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom und die Wirkung der HPV-Proteine

E6 und E7 auf die zellulären p53- bzw. Rb-Proteine fördern die maligne Zelltransformation. Die Anhäufung zusätzlicher genetischer Veränderungen ist notwendig, um eine vollständige Transformation einschließlich des Erwerbs von invasiven und metastatischen Phänotypen zu bewirken. (JOHNSON et al., 2020) (Abbildung aus (JOHNSON et al., 2020)).

### 2.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose

Die Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region veränderte sich in den letzten Jahrzehnten nicht wesentlich. Bei klinischem Verdacht auf ein HNSCC erfolgt die histopathologische Sicherung der Verdachtsdiagnose im Rahmen einer sogenannten „Panendoskopie“ (Tracheobronchoskopie, Ösophagogastroskopie, Mikrolaryngoskopie, Naso-/Oro-/Hypopharyngoskopie) durch eine Probenentnahme, wobei die Panendoskopie darüber hinaus der Ausdehnungsbestimmung des Tumors sowie dem Ausschluss von Zweitmalignomen dient. Ergänzend müssen obligate Staging-Untersuchungen in Form einer CT- oder MRT-Bildgebung des Halses und des Thorax sowie einer CT oder einer Sonographie des Oberbauchs durchgeführt werden (JOHNSON et al., 2020). Die PET-CT wird, falls verfügbar, für das Staging von Fernmetastasen bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren oder Lymphknotenbefall in den letzten Jahren bevorzugt eingesetzt und hat besondere Bedeutung bei Patienten mit einem sog. CUP-Syndrom und Patienten, die mit einer primären Radiochemotherapie behandelt werden (PFISTER et al., 2020). Durch das verbesserte Verständnis der Tumorätiologie und dem Zuwachs HPV positiver HNSCCs, gilt die Bestimmung des HPV-Tumorstatus als fester Bestandteil der Diagnostik, insbesondere bei OPSCCs. Deutlich wird dies in der Berücksichtigung des HPV-Tumorstatus in der achten Version der TNM-Klassifikation für HNSCCs (AMIN et al., 2017). Für einen möglichst validen HPV-Nachweis sollten Methoden genutzt werden, die zum Einen transkriptionsaktive Infektionen nachweisen, da eine vorübergehende Infektion nicht ausreicht, um ein Karzinom zu entwickeln (BEGUM et al., 2005) und zum Anderen eine Übereinstimmung mit Hochrisiko-HPV Subtypen erfolgen, da diese mit malignen Prozessen in Verbindung gebracht werden (MARUR et al., 2010). Zur Bestimmung des HPV-Status stehen zahlreiche Alternativen zur Verfügung: PCR (HPV DNA Detektion), RT-PCR (E6 und E7 mRNA Detektion), p16 Immunhistochemie, in-situ-Hybridisierung der HPV-DNA (DNA-ISH), sowie in-situ-Hybridisierung der RNA (RNA-ISH) (AUGUSTIN et al., 2020). Im Rahmen der verschiedenen Testmöglichkeiten ist zu beachten, dass, laut Empfehlungen des College of American Pathologists, immer eine Testung an Gewebeproben erfolgen sollte (LEWIS et al., 2018). Obwohl in den Empfehlungen der WHO und der IARC (Weltgesundheitsorganisation/Internationale Agentur für Krebsforschung) eine In-situ-Hybridisierung und/oder PCR und/oder Anti-p16-Immunchemie im Allgemeinen befürwortet werden (EL-NAGGAR et al., 2017), zeigen neue Studien, dass vor allem auch der Kontext der Fragestellung die Art der HPV Testung beeinflussen sollte (KÜHN et al., 2021). Im Rahmen prognostischer Fragestellungen sei die alleinige Bestimmung von p16 ausreichend, wohingegen bei der Therapiestratifizierung ein direkter Nachweis von HPV-DNA hinzugefügt werden sollte (KÜHN et al., 2021), um bei der zunehmend an Bedeutung gewinnenden Strategie der Therapiede Eskalation bei HPV-assoziierten OPSCCs falsch-positive HPV-Testergebnisse unbedingt

vermieden werden müssen. Neben der HPV- Tumorstatus Bestimmung erlangt die Untersuchung auf EBV-DNA im Blutplasma der Patienten, im Rahmen der Diagnostik der seltenen Nasopharynxkarzinome, einen immer größer werdenden Stellenwert (JOHNSON et al., 2020). Aufgrund der niedrigen Inzidenz dieser Tumorentität in Europa ist die Bestimmung der EBV-DNA in Deutschland aber von untergeordneter Bedeutung und nur in Einzelfällen relevant (MAHDAVIFAR et al., 2016).

Die Therapie der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals Region bestand viele Jahre aus einer Kombination von primärer Operation, sowie in Abhängigkeit des Tumorstadiums, adjuvanter Radiatio oder adjuvanter RCT mit platinhaltigen Chemotherapeutika, Taxanen und/oder Fluoruracil (SHIBATA et al., 2021). Als Therapiealternativen stehen in frühen Stadien eine alleinige Radiatio und bei lokal fortgeschrittenen Tumoren eine primäre RCT zur Verfügung, mit in retrospektiven Studien annähernd gleich gutem Outcome der therapierten Patienten (LEE et al., 2020; MACHIELS et al., 2020). Trotz dieser multimodalen und interdisziplinären therapeutischen Therapieregime konnte keine Verbesserung der schlechten Prognose mit einem 5-Jahres-Überleben von durchschnittlich 55% innerhalb der letzten Jahrzehnte erzielt werden (GOEL et al., 2022). Im Zuge der Decodierung der molekularen Pathways in der Entstehung von HNSCCs entstanden jedoch verschiedene Ansätze einer zielgerichteten Therapie, auch „targeted therapy“ genannt (KOZAKIEWICZ, GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, 2018). Hierbei sei vor allem der monoklonale Antikörper gegen das Transmembranprotein EGFR „Cetuximab“ genannt, der die durch EGFR ausgelöste Signalkaskade über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase und den mTOR-Signalweg unterbindet und somit die Aktivierung bestimmter Gene zur Tumorentstehung und Metastasierung im Zellkern verhindert (GOEL et al., 2022). Der klinische Benefit von Cetuximab zeigt sich vor allem in Kombination mit einer Radiatio, bei der ein verbessertes Gesamtüberleben sowie ein verbessertes progressionsfreies Überleben (progression free survival, PFS) verglichen mit einer alleinigen Radiatio beobachtet wurde (BONNER et al., 2006; GOEL et al., 2022). Dennoch bleibt der Einsatzbereich von Cetuximab auf wenige HNSCC-Patienten beschränkt, z.B. im palliativen Setting im Rahmen des EXTREME-Protokolls (DE AZEVEDO et al., 2022) oder in der adjuvanten Therapie in Kombination mit einer Bestrahlung bei eingeschränktem Allgemeinzustand und/oder schlechter Nierenfunktion (MURARO et al., 2021). Die kürzlich publizierten Studien RTOG-1016 (GILLISON et al., 2019) und DeESCALATE-HPV (MEHANNA et al., 2019) konnten zeigen, dass die Kombination einer Radiatio mit Cetuximab in einem primär-kurativen Setting bei lokal fortgeschrittenen, HPV-positiven OPSCCs bzgl. des Gesamtüberlebens der klassischen Kombination aus Radiatio und Cisplatin unterlegen ist, was zeigt, dass auch Cetuximab trotz des relevanten klinischen Nutzens in einzelnen Fällen die Prognose der HNSCC-Patienten als Gesamtkollektiv vermutlich nicht wesentlich wird verbessern können. Daneben stellt seit wenigen Jahren der Einsatz von Immuntherapeutika in Form von Immuncheckpoint-Inhibitoren eine weitere therapeutische Option für HNSCC-Patienten dar (MEI et al., 2020) (BAUMAN et al., 2017). Das Verhindern einer Immunevasion durch Immune Checkpoint Inhibition und der somit verbundenen Aktivierung einer wirksamen Immunantwort kann den Phänotyp

und die Funktion von Tumorzellen beeinträchtigen, bösartige Zellen abtöten und eine adaptive Immunantwort auslösen (YU et al., 2022). Bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region sind die PD1-Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab für die Erst- und Zweitlinienbehandlung von Patienten mit rezidivierendem und/oder metastasiertem HNSCC (RM-HNSCC) zugelassen (BURTNESS et al., 2019; COHEN et al., 2019; FERRIS et al., 2016). Trotz des damit verbundenen Paradigmenwechsels in der Therapie der HNSCCs und dem beobachteten klinischen Benefit (CILLO et al., 2020) wurden in allen publizierten Phase-III-Studien und real-World-Daten der Therapie mit PD-1 Inhibitoren nur Ansprechraten von unter 25%, sowie eine sich häufig im Verlauf der Therapie ausbildende Therapieresistenz beobachtet (BAUML et al., 2019). Valide prädiktive Biomarker zu identifizieren, die das Ansprechen auf die sehr kostenintensive Checkpoint-Inhibitor-Therapie vorhersagen können und so eine zielgerichtete Therapie ermöglichen, sind daher eine der zentralen Herausforderungen in der immun-onkologischen Forschung.

Die Prognose der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals Region hängt wesentlich von verschiedenen histopathologischen und klinischen Faktoren ab. Hierbei zeigen HPV-positive Tumore eine signifikant verbesserte Prognose (MAGNES et al., 2021). Ein durch vermehrte Infiltration von CD4+ und aktivierten CD8+ T-Zellen, sowie einer verminderten Anzahl von regulatorischen T-Zellen gekennzeichnetes Tumor microenvironment (TME) trägt hierbei entscheidend zu dem verbesserten Gesamtüberleben bei (LECHNER et al., 2019). Die Veränderung des TMEs HPV-positiver HNSCCs führt zu einer verbesserten Ansprechraten von Checkpoint Inhibitoren, was sich in der KEYNOTE-012 Studie, zur Untersuchung von vorbehandelten, und rezidierten/metastasierten HNSCCs mit Pembrolizumab, in Gesamtansprechraten von 24 % bei Patienten mit p16-positiver Erkrankung gegenüber 16 % bei Patienten mit p16-negativen Tumoren widerspiegelt (MAGNES et al., 2021). Neben der komplexen Mutationslandschaft der HNSCCs zeigt das Tumor Microenvironment der Kopf-Hals Karzinome einen maßgeblichen Einfluss auf die Prognose der Patienten (MANDAL et al., 2016). Die Zusammensetzung des TMEs, sowie das Ausmaß der Immuninfiltration und -aktivierung unterscheidet sich je nach klinischen und genetischen Merkmalen wie HPV-Status, Tumorlokalisierung, molekularem Subtyp, Raucherhistorie und genomischer Instabilität signifikant. Dieses Maß an Heterogenität der Immuninfiltration und -aktivität scheint klinisch relevante Prozesse darzustellen, da es in hohem Maße mit dem Outcome der Patienten korreliert (MANDAL et al., 2016). Neben der immunologischen Komponente beeinflussen klinische, molekulare sowie pathologische Faktoren wie der Befall von Lymphknoten (ZÄTTERSTRÖM et al., 1991), der Allgemeinzustand des Patienten (DE CÁSSIA BRAGA RIBEIRO et al., 2003), die Tumorlokalisierung (SNOW et al., 1977), der HPV-Tumorstatus (ANG et al., 2010), und das UICC Stadium (POLANSKA et al., 2014) die Prognose entscheidend. HPV-positive HNSCCs nehmen hierbei eine Sonderstellung ein, die durch ein vermehrtes Auftreten in jüngeren Patienten und einem verbesserten Therapieansprechen zu einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben führen (SUN et al., 2021b). Zu sehen ist diese Prognoseverbesserung anhand einer 3-Jahres-Überlebensrate von 82% bei lokal fortgeschrittenen HPV-positiven HNSCCs gegenüber 57% bei



lokal fortgeschrittenen HPV-negativen HNSCCs (SUN et al., 2021b). Trotz des Nachweises epigenetischer Veränderungen in HPV-positiven HNSCCs konnte nicht eindeutig geklärt werden, wodurch die verbesserte Ansprechrate auf eine RT, RCT sowie primäre chirurgische Therapie mit adjuvanter Behandlung im Falle HPV positiver Tumore bedingt ist und ist somit weiterhin Gegenstand aktueller Forschung (CAMUZI et al., 2021).

## **2.2 Immunologisches Tumor microenvironment von Kopf-Hals Karzinomen**

### *2.2.1 Humanes Immunsystem*

Das humane Immunsystem bezeichnet ein komplexes Netzwerk von lymphatischen Organen, Zellen, humoralen Faktoren und Zytokinen. Die ständige Exposition gegenüber pathogenen Organismen, die eingeatmet oder verschluckt werden oder unsere Haut und Schleimhäute besiedeln, zeigt die essenzielle Funktion des Immunsystems als Abwehrmechanismus des Menschen auf. Ob die beschriebenen Organismen eine Krankheit verursachen hängt jedoch hauptsächlich von der Pathogenität des Organismus, sowie der Integrität der Abwehrmechanismen des Wirtes ab (PARKIN, COHEN, 2001). Das Immunsystem gliedert sich in zwei Teile, die sich durch ihre unterschiedliche Geschwindigkeit und ihre unterschiedliche Spezifität der Immunreaktion auszeichnen: die angeborene/unspezifische Immunabwehr und die adaptive/spezifische Immunabwehr (KUMAR et al., 2011; SUN et al., 2020). Im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr kommt es im Falle einer Durchdringung der epithelialen Oberfläche durch Mikroorganismen wie Bakterien zu einer Identifikation der Mikroorganismen durch Zellen, die eine unspezifische Immunantwort auslösen können. Zu diesen Zellen gehören unter anderem Makrophagen, die mit ihrer phagozytischen Eigenschaft Bakterien über Oberflächenrezeptoren erkennen und binden können. Durch die Bindung der bakteriellen Moleküle kommt es zur Aktivierung der Makrophagen, was zu einer Sezernierung von Zytokinen führt. Als Zytokine werden freigesetzte Proteine von Zellen bezeichnet, die das Verhalten anderer Zellen beeinflussen. Neben Zytokinen erfolgt die Freisetzung von Chemokinen, die chemokinrezeptortragende Zellen wie Monozyten und neutrophile Granulozyten anlocken. Durch die Freisetzung der Zytokine und Chemokine als Antwort auf die bakterielle Infektion, wird ein Entzündungsprozess initiiert. Der Entzündungsprozess wie auch die Phagozytose der eindringenden Bakterien wird zusätzlich, neben der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen, durch die Aktivierung des Komplementsystems unterstützt. Das Komplementsystem stellt eine Kaskade von Plasmaproteinen dar, die zur Aktivierung von proteolytischen Reaktionen auf der Oberfläche der Mikroorganismen führt (JANEWAY CA JR et al., 2001). Zytokine und Komplementfaktoren zeigen zusätzlich Effekte auf die Adhäsionseigenschaften des Endothels, was dazu führt, dass zirkulierende Leukozyten haften bleiben und diese durch die anziehende Eigenschaft der Chemokine zum Infektionsherd migrieren. Die häufigsten Zelltypen in dieser initialen Phase der Immunantwort stellen neutrophile Granulozyten dar. Ähnlich den Makrophagen besitzen die neutrophilen Granulozyten Oberflächenrezeptoren für bakterielle Bestandteile und Komplementfaktoren. Neutrophile Granulozyten stellen durch ihre phagozytierenden und

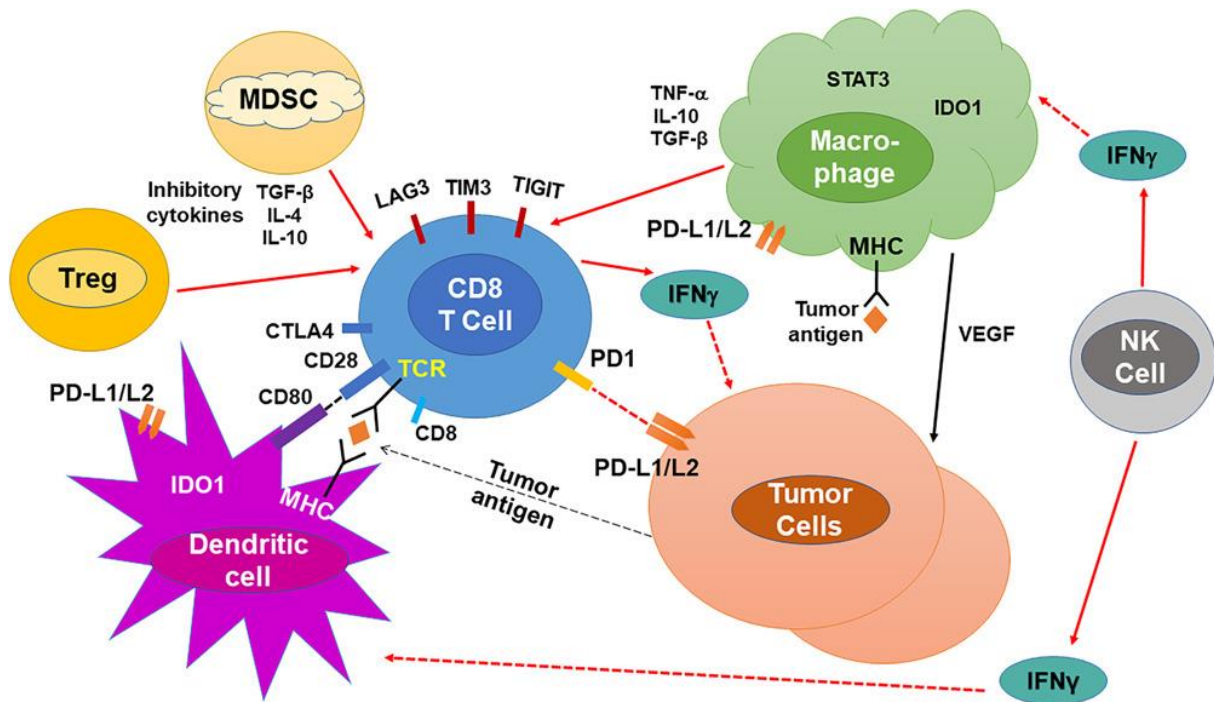
destruierenden Eigenschaften die wichtigsten Zellen in der initialen Bekämpfung der eindringenden Mikroorganismen dar (JANEWAY CA JR et al., 2001). Auf den Zustrom von neutrophilen Granulozyten folgen kurze Zeit später Monozyten, die sich rasch zu Makrophagen differenzieren. Makrophagen und neutrophile Granulozyten werden daher auch als Entzündungszellen bezeichnet. Die Makrophagen und die neutrophilen Granulozyten der initialen beziehungsweise unspezifischen Immunantwort stellen einen ersten Abwehrmechanismus in der Bekämpfung invadierender Mikroorganismen dar und sind für die Kontrolle der Mehrzahl aller bakterieller Infektionen unerlässlich. Eine Eliminierung der infektiösen Organismen durch das unspezifische Immunsystem ist jedoch nicht immer möglich, weswegen das adaptive Immunsystem mit der Fähigkeit, Krankheitserreger spezifisch zu erkennen und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, einen unverzichtbaren Teil der Immunabwehr darstellt. (JANEWAY CA JR et al., 2001; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2015). Das spezifische Immunsystem basiert hierbei auf der klonalen Selektion von Lymphozyten mit antigenspezifischen Rezeptoren. Unterschieden wird im Rahmen der spezifischen Immunantwort zwischen zellulären und humoralen Mechanismen. Die Induktion der zellulären Komponente des spezifischen Immunsystems beginnt, sobald es zur Aufnahme des Erregers durch unreife dendritische Zellen im infizierten Gewebe kommt. Die Funktion der dendritischen Zellen stellt hierbei nicht die Zerstörung des Pathogens dar, sondern vielmehr der Transport und die Präsentation des Pathogens gegenüber den in sekundär lymphatischen Organen rezirkulierenden T-Lymphozyten. Nach Aufnahme des Pathogens durch die dendritische Zelle erfolgt die Aktivierung dieser zu einer antigenpräsentierenden Zelle, sowie der Transport in Lymphknoten. Dort erfolgt die Präsentation der Antigene via MHC-Rezeptoren der antigenpräsentierenden Zellen. MHC I-Rezeptoren interagieren hierbei mit CD8+ T-Lymphozyten und MHC-II Rezeptoren mit CD4+ T-Lymphozyten. Im Falle einer spezifischen Bindung des T-Zell Rezeptors der naiven T-Zellen mit dem MHC-Molekül der dendritischen Zelle erfolgt die Aktivierung der naiven T-Zelle. Dieses sogenannte Priming naiver T-Zellen kann nur unter gewissen Voraussetzungen wie der spezifischen Interaktion des T-Zell Rezeptors und dem MHC/Antigen-Komplex, sowie einer Interaktion zwischen dem Oberflächenmolekül CD28 der T-Zelle und dem B7 Molekül der dendritischen Zelle ablaufen. Durch eine autokrine Interleukin 2 Sekretion kommt es zur massiven Proliferation der aktivierten T-Zellen, was zu einer ausreichenden Zahl an antigenspezifischen Effektorzellen führt (HOF, DÖRRIES, 2017; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2015). Im Anschluss an die Proliferation erfolgt unter Zytokineinfluss die Differenzierung der T-Effektorzellen zu CD4+ bzw. CD8+ T-Effektorzellen sowie T-Gedächtniszellen. Zu beachten sind hierbei die bereits während der thymalen Reifung der T-Lymphozyten ausgebildeten Oberflächenmoleküle CD4 oder CD8, die nach der Aktivierung der T-Effektorzellen den Effektorsubtyp mitbestimmen. Der Effektorsubtyp ist jedoch hauptsächlich von der Art des Zytokineinflusses abhängig. Der Einfluss von IFN- $\gamma$  auf CD4+ T-Zellen führt so zur Ausbildung einer TH1-Zelle, wohingegen eine Stimulation mit IL-4 zur Ausbildung einer TH2-Zelle führt. Neben den bereits erwähnten Subtypen der CD4+ Effektorzellen, TH1 und TH2, sind die Subtypen TH17, die folliculären T-Helferzellen sowie die

regulatorischen T-Zellen weitere Varianten der CD4+ Effektorzellen (ABBAS et al., 1996). Im Gegensatz zu der durch Zytokinproduktion getriggerten Funktion der CD4+ Effektorzellen zur Entwicklung weiterer naiver CD4+- Helferzellen, fungieren die CD8+ Effektorzellen als Apoptose induzierende, sog. „Killerzellen“. Diese zytotoxische Funktion wird durch die Freisetzung proapoptotischer und zytotoxischer Substanzen wie Perforine oder Granzyme, sowie einer direkten Aktivierung des Fas-Rezeptors ermöglicht. Die Aktivierung naiver B-Zellen stellt eine weitere Stütze der adaptiven Immunabwehr dar. Diese erfolgt über das Oberflächenimmunglobulin der B-Zellen: der sogenannte B-Zell Rezeptor. Der B-Zell Rezeptor fungiert, im Falle einer Antigenbindung, als Überleitung von Signalen in das Innere der Zelle. Die Erkennung des Antigens kann im Rahmen der B-Zell Aktivierung auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen: als membrangebundenes Antigen über dendritische Zellen oder Makrophagen, sowie über eine direkte Erkennung von löslichen Antigenen durch die B-Zellen selbst. Eine weitere Funktion des B-Zell Rezeptors stellt die Transportfunktion dar, die das gebundene Antigen nach intrazellulär transportiert, wo es fraktioniert wird und an MHC II Moleküle gebunden zurück an die Oberfläche gebracht wird. Der Peptid-MHC-II-Komplex kann von antigenspezifischen folliculären T-Helferzellen erkannt werden, die dadurch zur Bildung von Proteinen angeregt werden, was die B-Zelle zur Proliferation und zur Differenzierung in Antikörper-sezernierende Zellen veranlasst (JANEWAY CA JR et al., 2001). Ähnlich der T-Zell Aktivierung benötigt die B-Zelle neben der Bindung des MHC-II-Komplexes mit dem B-Zell Rezeptor ein weiteres spezifisches, stimulatorisches Signal zur Aktivierung. Dieses Signal stellt die Bindung eines co-stimulatorischen Moleküls der T-Zelle in Form der Oberflächenmoleküle CD30 oder CD40 dar. Durch die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen entsteht ein sogenannter Primärfokus, indem es zur Produktion IgM-produzierender Plasmablasten kommt. Aufgrund des nur temporären Bestehens des Primärfokus bildet sich zeitgleich das sogenannte Keimzentrum. Das Keimzentrum stellt eine Ansammlung von sich teilenden B-Zellen, sowie für dasselbe Antigen spezifischen T-Zellen dar. In Rahmen der Keimzentraubildung erfolgt die Produktion der B-Gedächtniszellen und antikörperproduzierenden Plasmazellen mit hoher Affinität und Spezifität für das jeweilige pathogene Antigen. Die soeben beschriebenen zellulären Mechanismen der B-Zell-Aktivierung bilden die Grundlage der humoralen Immunantwort. Die von reifen Plasmazellen sezernierten Immunglobuline verfügen über die Möglichkeit der Neutralisation von erkannten Pathogenen, sowie über die Möglichkeit zur Unterstützung der unspezifischen Immunantwort. Die Abwehr von Pathogenen erfolgt neben der direkten Neutralisation und der Auslösung der Komplementkaskade auch über eine sog. Opsonierung. Hierbei wird das Pathogen durch den Antikörper markiert, sodass andere Immunzellen das Pathogen besser erkennen und destruieren können (ALBERTS B, 2014). Wichtig für die permanente Immunabwehr ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Nach der ersten Infektion eines Pathogens und der erfolgten primären Immunantwort bilden sich sogenannte Gedächtniszellen, die im Falle einer Reinfektion eine schnellere und effektivere Immunantwort induzieren. Unterschieden wird hierbei in B- und T-Gedächtniszellen. T-Gedächtniszellen sind sowohl im peripheren Gewebe wie

auch in sekundär lymphatischen Organen und dem Blut lokalisiert. Im Rahmen der sekundären Immunantwort benötigen T-Gedächtniszellen weniger Antigenkontakt und Co-Stimulation für ihre Aktivierung und führen zu einer schnelleren und effektiveren Proliferation und Differenzierung von T-Effektorzellen. Im Gegensatz zu den T-Zellen befinden sich B-Gedächtniszellen vornehmlich in Lymphknoten und der Milz. Zur Aktivierung der B-Gedächtniszellen wird ebenfalls ein geringerer Antigenkontakt benötigt, um eine effektivere Funktion zu erlangen. Weiterhin benötigen B-Gedächtniszellen weniger Kontakt zu folliculären T-Helferzellen, um sich zu Plasmazellen mit hoher Antigenspezifität zu differenzieren (KIRMAN et al., 2019).

### *2.2.2 Einfluss des Immunsystems auf das Tumormikromilieu von Kopf-Hals Karzinomen*

Das Immunsystem des Menschen zeigt im Kontext der Karzinogenese von Kopf-Hals Karzinomen einen erheblichen Einfluss auf die heterogene Ansammlung von infiltrierenden und residenten Wirtszellen, sezernierten Faktoren und auf die extrazelluläre Matrix. Dieses sogenannte „tumor microenvironment“ (Synonym: Tumormikromilieu, TME) bezeichnet eine komplexe und sich ständig verändernde Mikroumgebung des Tumors, zu deren charakteristischen Bestandteilen Immunzellen, Stromazellen, Blutgefäße und die extrazelluläre Matrix zählen. Studien der letzten Jahre legen nahe, dass das Tumormikromilieu nicht nur ein stiller Zuschauer, sondern vielmehr ein essenzieller Einflussfaktor in der Entstehung und Progression von Tumoren ist (ANDERSON, SIMON, 2020). Die Heterogenität der Immunzellen des Tumormikromilieus (siehe Abbildung 3) spiegelt sich in immunsuppressiven Effekten, vor allem ausgelöst durch myeloide Suppressorzellen (MDSC), regulatorische T-Zellen (Treg) und tumorassoziierte Makrophagen (TAM), sowie in einer anti-tumoralen Immunität u.a. vermittelt durch zytotoxische T-Zellen (CTL) und natürlichen Killerzellen wider (HINSHAW, SHEVDE, 2019). Das im Gesamten als eher immunsuppressives Krankheitsbild charakterisierte HNSCC (LONG et al., 2021) zeigt häufig eine Immunevasion die u.a. als Ergebnis der Herunterregulierung der Expression des humanen Leukozytenantigens (HLA) gewertet wird. Die Herunterregulierung des HLA führt wiederum zu einer verminderten Erkennung der Tumorzellen durch die Immunzellen der Mikroumgebung (CHEN et al., 2020). Durch die Kommunikation der Tumorzellen mit den Zellen des TMEs steigt weiterhin die Anpassungsfähigkeit der HNSCCs an ihr Tumormikromilieu, was die Tumorprogression wie auch die therapeutische Wirkung erheblich beeinflusst (WANG et al., 2021).



**Abbildung 3: Immunologisches Tumormikromilieu von Kopf-Hals-Karzinomen.** Schematische Darstellung der tumorassoziierten Immunzellen und interzellulärer Mechanismen zur Entstehung eines immunsuppressiven Milieus im Tumormikromilieu der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals Region. Dargestellt sind die Interaktionen zwischen Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), dendritischen Zellen, CD8+T-Lymphozyten, regulatorischen T-Zellen, myeloiden Suppressorzellen (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) und Tumorzellen. (Abbildung aus (CHEN et al., 2020))

Diese bidirektionale Kommunikation zwischen Tumorzellen und TME verdeutlicht die zentrale Rolle des Tumormikromilieus, dessen molekulare Mechanismen und dessen heterogene Zusammensetzung Bestandteil aktueller Forschung sind, um neue therapeutische Ansätze zur Verbesserung der Prognose von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region zu identifizieren (KÜRTEEN et al., 2021). Im Folgenden wird auf die in dieser Arbeit sowohl in der RNA-Sequenzierung als auch Immunhistochemie untersuchten Zellen näher eingegangen, sowie deren prognostischer Einfluss und deren Bedeutung innerhalb des Tumor microenvironment beschrieben.

#### 2.2.2.1 Naive B Zellen

B-Zellen stellen neben den T-Zellen einen weiteren wichtigen Teil der adaptiven Immunabwehr innerhalb des TMEs dar. Trotz der relativ spärlichen Datenlage über die Funktion der B-Zellen innerhalb des Tumormikromilieus konnten Studien die Bedeutsamkeit dieser Immunzellen für die antitumorale Immunität zeigen (DOWNS-CANNER et al., 2022). Innerhalb der B-Zell Population sind die durch verschiedene Oberflächenimmunphänotypen und diverse Funktionen gekennzeichneten, heterogenen Subtypen zu beachten. Hierbei konnten sowohl Gedächtnis-B-Zellen, aktivierte Gedächtnis-B-Zellen, Plasmablasten sowie naive B-Zellen im Tumormikromilieu nachgewiesen werden (HELMINK et al., 2020). Naive B-Zellen sind hierbei als B-Zellen definiert, bei denen noch kein Antigenkontakt stattgefunden hat (LOPES-CARVALHO, KEARNEY, 2004). Nur wenige Studien befassten sich mit

der molekularen Funktion und der prognostischen Auswirkung der naiven B-Zellen in Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen. Eine mögliche Chemotaxis naiver B-Zellen in das Tumor microenvironment der HNSCCs mit darauffolgender Differenzierung konnte in jüngsten Studien nachgewiesen werden. Durch die Migration und Differenzierung der naiven B-Zellen kommt es zur Stimulierung der immunsuppressiven Eigenschaften der naiven B-Zellen, was wiederum die antitumorale Immunreaktion abschwächt (SARVARIA et al., 2017). Trotz der immunsuppressiven Eigenschaft der naiven B-Zellen in HNSCCs konnten prognoseverbessernde Effekte der naiven B-Zellen in anderen Tumorentitäten nachgewiesen werden. So zeigten Studien an Neuroblastomen, dass naive B-Zellen der beständige Indikator einer guten Prognose in dieser Tumorentität sind und ein im Gesamten antitumoral wirkendes Tumormikromilieu induzieren (SCHAAFSMA et al., 2021). Neben den prognostischen Aspekten der verschiedenen B-Zellsubtypen innerhalb des TMEs sind diese auch für das Ansprechen auf eine Checkpoint Inhibitortherapie relevant. Wie *Ruffin et al.* zeigen konnten wiesen Melanompatienten, die auf die Standardimmuntherapie in Form von Anti-PD1- und/oder Anti-CTLA4-Antikörpern nicht ansprachen, signifikant mehr naive B-Zellen als die Responder auf. Dieses Verteilungsungleichgewicht stellt eine potentielle Grundlage für eine Möglichkeit zur Ergänzung der derzeitigen immuntherapeutischen Strategien bei Kopf- und Halskarzinomen dar mit dem Ziel durch die Aktivierung und Transformation naiver B-Zellen hin zu Keimzentrum-Phänotypen eine antitumorale Immunstimulation zu erreichen (RUFFIN et al., 2021).

#### 2.2.2.2 Lymphozyten

Die Bedeutsamkeit tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) innerhalb des Tumormikromilieus konnte in den letzten Jahren durch diverse Studien belegt werden (SUZUKI et al., 2022; ZHANG et al., 2021). Die Auslösung funktionaler Defekte und die Induktion der Apoptose von Lymphozyten stellt eine wichtige Strategie der Immunevasion von HNSCCs dar (SUN et al., 2022). Die konsekutive Depletion der Lymphozyten führt zu einer verminderten Fähigkeit des Immunsystems zur Freisetzung von Zytokinen und zur Lyse maligner Tumorzellen (MUMBERG et al., 1999; XU et al., 2017). Durch diese zentrale Rolle in der antitumoralen Immunität wird der prognostische Einfluss der TILs deutlich. Eine erhöhte Dichte an Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Tumor microenvironment korreliert signifikant mit einem verbesserten Gesamtüberleben, sowie einem signifikant verbessertem disease-free survival (DFS) von HNSCC Patienten (ZHANG et al., 2021). Tumorinfiltrierende Lymphozyten zeigen weiterhin eine Assoziation zur Raucherhistorie, zum Alkoholabusus, sowie zum T-Stadium der Patienten. So korrelieren ein langjähriger Alkohol- und Nikotinkonsum der Patienten mit vergleichsweise niedrigen Leveln an TILs, wohingegen ein niedriges T-Stadium eher mit einer stärkeren TIL-Infiltration im Tumormikromilieu assoziiert ist (XU et al., 2017). Über die prognostische Bedeutsamkeit hinaus konnten Studien, im Falle hoher TIL-Werte, ein besseres Ansprechen auf eine Radiochemotherapie vorhersagen, was tumorinfiltrierende Lymphozyten nicht nur als prognostischen, sondern auch als prädiktiven Biomarker bei Kopf- und Halskarzinomen interessant macht (SUZUKI et al., 2022). Anfängliche Bemühungen einer TIL basierten Immuntherapie in verschiedenen soliden

Tumorentitäten zeigten allerdings nur limitierten Erfolg. Durch das bessere Verständnis des TMEs konnten jedoch erste Fortschritte bei Patienten mit metastasierten Melanom, Zervixkarzinom und Ovarialkarzinom beobachtet werden (KAZEMI et al., 2022). HPV-positive HNSCCs und deren Onkoproteine E6 und E7 bilden neue Ziele der TIL basierten Immuntherapie, die im Rahmen einer Phase II Studie des National Cancer Institute erprobt wurde (STEVANOVIĆ et al., 2019). Trotz der prognostischen und prädiktiven Bedeutsamkeit der TILs spielt die Erfassung und Bewertung dieser Zellen derzeit noch keine Rolle im klinischen Alltag (ALMANGUSH et al., 2022). Zum einen liegt dies an der noch nicht ausreichenden Zahl an Studien (ALMANGUSH et al., 2022) und zum anderen, wie von *Xu et al.* beschrieben, an dem erheblichen Mangel an standardisierten und leicht anwendbaren Methoden zur Bestimmung der TIL-Dichte im TME von HNSCCs (XU et al., 2017).

### 2.2.2.3 Zytotoxische T-Zellen (CD8+ Zellen)

Zytotoxische T-Zellen nehmen eine elementare Funktion in der Immunabwehr des Menschen ein. Durch eine ständige Rezirkulation zwischen Gewebe, Organen und dem Lymphsystem interagieren sie dauerhaft mit körperfremden und körpereigenen Zellen. Durch die Präsentation pathogener Antigene über MHC-I Rezeptoren erfolgt die Freisetzung proapoptotischer Moleküle wie Perforine und Granzyme, die eine Apoptose der pathogenen Zelle induzieren (JANEWAY CA JR et al., 2001). Tumor infiltrierende Lymphozyten (TILs) zeigen im Kontext der Karzinogenese der HNSCCs einen erheblichen Einfluss auf die Tumorprogression und Metastasierung (DE RUITER et al., 2017). Speziell CD8+ T-Zellen zeigen durch eine Verbesserung der Prognose signifikante antitumorale Effekte. Neben der Verbesserung des Gesamtüberlebens konnte weiterhin eine signifikant längere Rezidivfreiheit beobachtet werden (SHIMIZU et al., 2019). Die prognostischen Auswirkungen der verstärkten Immunzellinfiltration des Tumormikromilieus durch zytotoxische T-Zellen sind hierbei unabhängig vom HPV-Tumorstatus. Sowohl HPV-negative wie auch HPV-positive HNSCCs mit erhöhter Dichte an zytotoxischen T-Zellen innerhalb des TMEs zeigen ein verbessertes klinisches Outcome (NÄSMAN et al., 2012). Die komplexe Zusammensetzung des TMEs und die interzelluläre Kommunikation führen, bei verstärkter Infiltration mit zytotoxischen T-Zellen, zu erheblichen Beeinflussungen anderer Zellen des Tumormikromilieus. Dies zeigt sich beispielsweise anhand des CD8+/FOXP3+ Quotienten (LEQUERICA-FERNÁNDEZ et al., 2021; NÄSMAN et al., 2012). Der prognostische Wert des Quotienten bleibt jedoch nicht unumstritten: so konnten *Näsman et al.* und *Chen et al.* durchaus positive Korrelationen eines erhöhten Quotienten mit einem signifikant verbesserten krankheitsfreien Überleben und einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben zeigen (CHEN et al., 2018; NÄSMAN et al., 2012), wohingegen *Lequerica-Fernandez et al.* ein verbessertes Gesamtüberleben bei niedrigem, peritumoralem CD8+/FOXP3+ Verhältnis zeigen konnten (LEQUERICA-FERNÁNDEZ et al., 2021). Der CD8+/FOXP3+ Quotient zeigt neben den prognostischen Auswirkungen auch eine Assoziation zu einer erhöhten Expression von PD-L1 (LEQUERICA-FERNÁNDEZ et al., 2021). Die CheckRad-CD8 Studie von *Hecht et al.*, in der Patienten mit einem erhöhtem intratumoralem Level an zytotoxischen T-Zellen eine doppelte Radioimmuntherapie mittels Durvalumab und Tremelimumab erhielten,

unterstreicht das prognostische Potenzial sowie die zentrale Rolle der zytotoxischen T-Zellen als Prädiktoren für das Ansprechen auf eine Immun-Chemotherapie sowie Immun-Radiotherapie mit einem signifikant verbessertem PFS (HECHT et al., 2022). Dieser Einfluss der zytotoxischen T-Zellen auf immuntherapeutische Ansätze unterstreicht das prognostische Potenzial dieses Immunzell-Subtyps und erfordert weitere Studien zur Validierung der Daten.

#### 2.2.2.4 Makrophagen

Makrophagen repräsentieren eine wichtige Zellpopulation der initialen Immunabwehr. Mit der Erkennung körperfremder Proteine und Glycoproteine auf der Oberfläche pathogener Erreger, wie Viren oder Bakterien, wird der Prozess der Phagozytose induziert. Durch die intrazelluläre Fragmentierung des Pathogens erfolgt die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen, sowie die Präsentation des fragmentierten Antigens über MHC-II Moleküle, was zeitgleich die Aktivierung des erworbenen Immunsystems über T-Helferzellen darstellt (JANEWAY CA JR et al., 2001; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2015). Innerhalb des Tumormikromilieus nimmt die heterogene Population der Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und Progression von HNSCCs ein (ZHU et al., 2021). Die Unterscheidung in proinflammatorische M1- und immunsuppressive M2- Makrophagen-Subtypen ist hierbei von entscheidender prognostischer Bedeutung. Die als klassisch aktivierte Makrophagen bezeichneten M1 Makrophagen werden durch Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), sowie weiteren proinflammatorischen und immunstimulierenden Zytokinen wie IL-12 induziert (LEWIS, POLLARD, 2006; NAJAFI et al., 2019). Dadurch kann eine Th1 basierte Immunreaktion ausgelöst werden, die zur Beseitigung von Krankheitserregern, sowie zu einer verstärkten antitumoralen Immunaktivität führt (ARNOLD et al., 2014). Im Gegensatz hierzu sezernieren die durch IL-4 und/oder IL-13 induzierten M2 Makrophagen verschiedene Zytokine in Form von IL-10, IL-1-Rezeptor-Antagonisten und eine Vielzahl von Chemokinen, die zu einer Th2-Immunreaktion führen. Die Th2-basierte Immunreaktion beteiligt sich hauptsächlich am Zellwachstum, an der Angiogenese, der Immunsuppression, und der Gewebereparatur, wodurch vor allem das Tumorwachstum gefördert wird (ZHU et al., 2021). Wie von *Kumar et al.* beschrieben zeigt eine erhöhte Dichte an M2 Makrophagen innerhalb des Tumormikromilieus eine Assoziation mit einem fortgeschrittenen T-Stadium, erhöhten Raten von Lymphknotenbefall, Vorhandensein von Gefäßinvasion sowie vermehrter lymphatischer Invasion (KUMAR et al., 2019). Aufgrund der wachsenden Bedeutung der Immuntherapie und targeted therapy sind TAMs als mögliches Ziel neuer Therapieformen in den Fokus der Forschung gerückt. Hierbei können die verschiedenen Arten der zielgerichteten TAM Therapie in drei Kategorien eingeteilt werden: Verminderung der TAMs, Förderung der TAM assoziierten Phagozytose und Transformation der immunsuppressiven TAMs in proinflammatorische TAMs (ZHU et al., 2021). In allen drei Bereichen konnten bereits erste Erfolge erzielt werden. So zeigten erste Studien eine Verringerung der immunsuppressiven M2- TAMs durch die Verwendung von T-Zellen, bei der die endogene T-Zell Zytotoxizität auf spezifische M2-TAMs gelenkt werden konnte (SCOTT et al., 2019). Zur Förderung der Phagozytose konnten Studien über die



gleichzeitige Inhibierung der CSF1-R und SHP2 Signalwege eine Strategie zur Makrophagen basierten Immuntherapie ausarbeiten (RAMESH et al., 2019).

#### 2.2.2.5 Follikuläre T-Helfer Zellen

Follikuläre T-Helferzellen stellen einen wichtigen Subtyp der CD4+ T-Effektorzellen dar. Durch die essentielle Unterstützung der B-Zellen zur Produktion potenter Antikörperreaktionen sind sie maßgeblich an der adaptiven Immunreaktion beteiligt (JANEWAY CA JR et al., 2001). Unter Beachtung der molekularen Funktion der follikulären T-Helferzellen ist es nicht verwunderlich, dass ein hoher Gehalt an follikulären T-Helferzellen innerhalb des Tumormikromilieus in vielen soliden Tumorentitäten mit einem besseren Outcome assoziiert ist (BAUMJOHANN, BROSSART, 2021). Die prognostische Wertigkeit der follikulären T-Helferzellen zeigt sich weiterhin darin, dass sie Voraussetzung einer wirksamen Immuntherapie mit PD-1 Inhibitoren sind. Grund hierfür ist die hohe Expression an PD-1, die sie zu attraktiven Zielen einer Anti PD-1 Therapie macht (SINGH et al., 2020). Die interzelluläre Kommunikation der follikulären T-Helferzellen und CD8+ zytotoxischen Zellen innerhalb des TME stellt des Weiteren eine wichtige Rolle für die Effektivität der durch Immuntherapie ausgelösten antitumoralen Immunantwort dar (NIOGRET et al., 2021). Trotz der Annahme, dass CD8+ CTL-Untergruppen als die primären zellulären Responder auf eine Anti-PD-1-Therapie gelten, konnten Studien eine signifikante Anreicherung von tumorinfiltrierenden follikulären T-Zellen nach einer Checkpoint-Blockade mit Anti-PD-1-Wirkstoffen beobachten, die Grund zur Annahme ist, dass follikuläre T-Helferzellen auch wichtige Ziele von Anti-PD-1-Therapien sein könnten (SINGH et al., 2020). Die prognostische Relevanz der follikulären T-Helferzellen konnte auch für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals Region gezeigt werden. So wiesen *Cillo et al.* eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens bei verstärkter Infiltration des Tumormikromilieus mit follikulären T-Helferzellen nach (CILLO et al., 2020). Weiterhin konnten *Sun et al* eine Assoziation der follikulären T-Helferzellen mit dem pathologischen Grading und einem erhöhten Patientenalter innerhalb einer TCGA-HNSC Kohorte feststellen (SUN et al., 2021a). Trotz der vielversprechenden Daten werden weitere Untersuchungen zur prognostischen und therapeutischen Relevanz der follikulären T-Helferzellen im TME benötigt, um die Evidenz dieser ersten Beobachtungen bei noch zu geringer Datenlage zu steigern.

#### 2.2.2.6 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Regulatorische T-Zellen (früher: Suppressor T-Zellen) bezeichnen einen spezialisierten Subtyp der T-Zellen. Nach der Entstehung der Tregs im Thymus erfolgt die Migration in das Tumormicroenvironment, in dem die Immunzellen ihren Teil zur komplexen immunologischen Tumorumgebung beitragen (DAVIS et al., 2016). Bei der Migration der Tregs in das TME spielen Chemokine, allen voran CCR4, eine essentielle Rolle (NISHIKAWA, SAKAGUCHI, 2014). Das Oberflächenprotein FOXP3 kann hierbei als Ziel der immunhistochemischen Detektion von Tregs genutzt werden. (WELLER et al., 2014). Die immunologische Funktion der regulatorischen T-Zellen,

in Form einer Vermeidung einer überschießenden Immunreaktion durch Unterdrückung einer adäquaten Immunantwort trägt entscheidend zum immunsuppressiven Milieu der HNSCCs bei. Durch die suppressive Wirkung auf zytotoxische T-Zellen sowie CD4+ T-Helferzellen und durch die Involvierung in die tumorale Immunevasion u.a. durch Sezernierung immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  nehmen die regulatorischen T-Zellen eine zentrale Rolle in der Karzinogenese und Tumorprogression von HNSCCs ein (ECONOMOPOULOU et al., 2020). Trotz des Nachweises einer erhöhten Anzahl an regulatorischen T-Zellen im Blut und im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten durch zahlreiche Studien (LIM et al., 2014; SUN et al., 2015), ist die prognostische Relevanz der Tregs weiterhin unklar (ECONOMOPOULOU et al., 2020) und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnten einige Studien ein schlechteres Gesamtüberleben assoziiert mit einem erhöhten Level an regulatorischen T-Zellen innerhalb des TMEs beziehungsweise im peripheren Blut nachweisen (AL-QAHTANI et al., 2011; WEED et al., 2015; WEED et al., 2013). Im Gegensatz dazu zeigte *Mandal et al.*, nach der Adjustierung für HPV-Status, CD8+ TIS und der CD56dim NK-Zell-Infiltration in einer Multivarianzanalyse, dass ein hoher Anteil regulatorischer T-Zellen im Tumormikromilieu von HNSCC-Patienten mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben verbunden ist (MANDAL et al., 2016). Gestützt wird diese Annahme durch die von *Seminero et al.* veröffentlichte Arbeit, in der ebenfalls ein verbessertes Gesamtüberleben bei vermehrter Infiltration tumorinfiltrierender, regulatorischer T-Zellen beobachtet wurde (SEMINERIO et al., 2019). Ein Erklärungsversuch der kontroversen, prognostischen Ergebnisse könnte die biologische Heterogenität der HNSCC-Patienten darstellen, da regulatorische T-Zellen je nach Lage des Primärtumors, Histologie und molekularem Profil durch unterschiedliche Eigenschaften charakterisiert sind (DE MEULENAERE et al., 2017). Im Zuge der Entwicklung neuer immuntherapeutischer Ansätze und der Relevanz der regulatorischen T-Zellen als eine der größten Subpopulationen unter allen zellulären Komponenten des immunologischen TME bei Kopf-Halskarzinomen (MANDAL et al., 2016), ist die therapeutische Eignung der Tregs Gegenstand aktueller Forschung. Therapeutische Zielstrukturen der regulatorischen T-Zellen stellen hauptsächlich die Oberflächenmarker CD25, FOXP3, verschiedene Chemokinrezeptoren, OX40 und GITR dar. Die Blockade dieser Oberflächenmarker und die Inhibition immunsuppressiver Zytokine, die die Funktion der Tregs unterdrücken könnte, beschreiben die gegenwärtigen Strategien einer Treg-basierten Immuntherapie (ECONOMOPOULOU et al., 2020). Erste vielversprechende Ergebnisse in murinen Modellen konnten mithilfe des kürzlich entwickelten Antisense-Oligonukleotid-Inhibitors von FOXP3, AZD8701, sowohl als Monotherapie wie auch in Kombination mit einer Immun-Checkpoint-Blockade, erzielt werden (REVENKO et al., 2022). Zurzeit (Stand Januar 2023) erfolgt die erste, humane, multizentrische Phase I-Studie des Antisense-Oligonukleotid-Inhibitors AZD8701 als Monotherapie sowie in Kombination mit Durvalumab bei 61 Tumorpatienten (u.a. HNSCC und NSCLC), die auf eine vorangegangene Immuntherapie mit PD-1 Therapie angesprochen haben. Erste Ergebnisse werden im Mai 2023 erwartet (NCT04504669).

### 2.3 „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA)

Der „Cancer Genome Atlas“ bezeichnet eines der ambitioniertesten und erfolgreichsten Krebsgenomik-Programme der Welt. Im Rahmen des TCGA-Programms wurden Genomsequenz-, Expressions- und Methylierungsdaten von über 11.000 Patienten mit mehr als 30 verschiedenen Krebsarten generiert, analysiert und der Wissenschaft öffentlich zugänglich gemacht (WANG et al., 2016). Seit der Einführung des Programms im Jahre 2006 durch eine Zusammenarbeit des „National Cancer Institute“ und des „National Human Genome Research Institute“, wurden über 2,5 Petabytes an genomischen, epigenomischen, transkriptomischen und proteomischen Daten generiert und veröffentlicht. Möglich wurde dies durch das Einsenden frisch gefrorener Tumorproben sowie Proben nicht-neoplastischen Gewebes, der Pathologieberichte, der klinischen Daten, der Behandlungshistorie und der Therapieergebnisse der Patienten durch die teilnehmenden Krankenhäuser an Biospecimen Core Resource (BCR). Im Rahmen der Aufbereitung der eingesendeten Proben wurden Gefrierschnitte angefertigt und zur digitalen Aufbewahrung eingescannt. In den meisten Fällen erfolgte aus Überprüfungsgründen weiterhin eine Anfertigung repräsentativer, mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbter Objektträger, die digital gescannt wurden. Die anschließenden molekularen Analysen erfolgten in ausgewiesenen Genomcharakterisierungszentren und Genomsequenzierungszentren. Die Auswertung und Integration der daraus folgenden Rohdaten wurde in speziellen Genomdaten-Analysezentren durchgeführt. Alle erhobenen Datensätze sind für weitere Analysen über das Genomic Data Commons Data Portal (<https://gdc.cancer.gov>) öffentlich zugänglich und wurden bereits in großem Umfang durch zahlreiche Arbeitsgruppen genutzt. Im Rahmen der Datenanalyse konnten die Genome Data Analysis Centers einige Hilfsmittel zur Visualisierung und Analyse der erhobenen Daten entwickeln, die den Zugang zu den Daten vereinfachen und eine interaktive Online-Auswertung der Daten ermöglichen. Beispiele für diese Hilfsmittel sind: <http://firebrowse.org>; <http://cbioportal.org>; <http://explorer.cancerregulome.org>; und <http://bioinformatics.mdanderson.org/tcgambatch> (COOPER et al., 2018). Nach der detaillierten Beschreibung, Analyse und Interpretation der durch das TCGA-Projekt gefundenen molekularen Veränderungen, die sich vor allem auf die Regionen des Genoms konzentrierten, die für Proteine kodieren, erfolgte in einem zweiten Schritt die Initiierung des „PanCancer“-Projekts (WEINSTEIN et al., 2013). Die Daten des TCGA wurden hier für weitere Untersuchungen zum besseren Verständnis der Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorentitäten verwendet. Die ersten Arbeiten des PanCancer Projekts behandelten den Vergleich der ersten 12 Tumorentitäten, die vom TCGA charakterisiert wurden. Das Ziel hierbei war es die molekularen Veränderungen und deren funktionale Rolle bei verschiedenen Tumorarten aufzuzeigen und zu verstehen, so dass Therapien, die bei einer Tumorentität wirken auf andere Tumorarten mit einem ähnlichen genomischen Profil ausgeweitet werden könnten (WEINSTEIN et al., 2013). Der enorme Erfolg des TCGA-Projekts führte zu einer Ausweitung des PanCancers Projekts, das mittlerweile mehr als 11.000 Patientenproben von insgesamt 33 Tumorentitäten charakterisieren konnte. Dadurch sind neben histologiespezifischen Analysen, wie der Pan-Plattenepithelzellen-Analyse, die Daten zu

Plattenepithelkarzinomen aller verfügbaren Lokalisationen (Kopf und Hals, Speiseröhre, Lunge etc.) umfasst und Mutationstreiber-Analysen, die aufgrund der großen Datenmenge auch seltenste Treibermutationen erfassen können, auch die Charakterisierung und Relevanz des Tumormikromilieus und der Immunzellinfiltration diverser Tumorentitäten möglich (COOPER et al., 2018). Das in dieser Arbeit verwendete TCGA-Patientenkollektiv umfasste 513 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Halsregion (TCGA-HNSC). Die Mehrzahl der Karzinome war hierbei in der Mundhöhle (n=309) lokalisiert. Larynxkarzinome (n=116), Oropharynxkarzinome (n=79) sowie Hypopharynxkarzinome (n=10) stellen die übrigen Tumorentitäten dieses Kollektivs dar.

## **2.4 Fragestellung dieser Arbeit**

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals Region stellen mit circa 600.000 jährlich neu diagnostizierten Patienten eine der bedeutsamsten Tumorentitäten des Menschen dar. Leider konnte trotz erheblicher Forschungsbemühungen die schlechte Prognose der betroffenen Patienten mit einer 5-Jahresüberlebensrate von derzeit ca. 55% in den letzten Jahrzehnten nicht wesentlich verbessert werden (DU et al., 2019). Auch die Einführung des monoklonalen Antikörpers gegen EGFR „Cetuximab“ im Jahre 2006 zeigte nur eine geringe Verbesserung des Gesamtüberlebens (CONCU, CORDEIRO, 2018). Der durch Immuntherapie vorangetriebene Paradigmenwechsel in der Therapie der HNSCC macht Hoffnung auf eine dauerhafte Verbesserung der Prognose der Patienten, insbesondere wenn die Indikationen für eine Immuntherapie zukünftig potenziell ausgeweitet werden können. Die anfängliche Euphorie im Rahmen der Zulassung der PD-1-Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab für die Erst- und Zweitlinienbehandlung von Patienten mit rezidivierendem und/oder metastasiertem HNSCC (RM-HNSCC) (BURTNESS et al., 2019; COHEN et al., 2019; FERRIS et al., 2016) wurde jedoch durch mäßige Ansprechraten von unter 20% sowie eine sich häufig im Verlauf der Therapie ausbildende Therapieresistenz gedämpft (BAUML et al., 2019). Aufgrund dessen ist ein tieferes Verständnis der prognostischen Bedeutung des immunologischen TME und der bidirektionalen Kommunikation zwischen zellulären Komponenten des TME und den Tumorzellen von hoher Bedeutung für die Entwicklung potenzieller neuer Therapiestrategien (MANDAL et al., 2016). Das TME von Plattenepithelkarzinomen spielt eine Schlüsselrolle in der Kontrolle, der Entwicklung und des Voranschreitens von HNSCCs und ist von größter Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapien und für die Verbesserung der Patientenprognose (ELMUSRATI et al., 2021). Die heterogene Zusammensetzung des Tumormikromilieus mit immunsuppressiv wirkenden Immunzellen wie myeloiden Supressorzellen (MDSC), regulatorischen T-Zellen (Treg) und tumorassoziierten Makrophagen (TAM) auf der einen, und proinflammatorischen, anti-tumoralen Zellen wie den zytotoxischen T-Zellen (CTL) und natürlichen Killerzellen auf der anderen Seite, lassen Spielraum für diverse Ansätze neuer Immuntherapie-Strategien (HINSHAW, SHEVDE, 2019). Vor diesem Hintergrund bestand die Zielsetzung dieser Arbeit darin, die prognostische Bedeutung der einzelnen

Komponenten des immunologischen Tumormikromilieus bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Halsregion zu analysieren und so die vielversprechendsten Zielstrukturen künftiger Immuntherapie-Ansätze zu identifizieren. Hierbei sollte eine detailliertere Analyse der einzelnen Immunbiomarker einschließlich der Vielzahl an Immunzellsubtypen erfolgen, um so wertvolle Rückschlüsse auf den Einfluss dieser individuellen Faktoren auf die Prognose der Patienten zu erhalten. Des Weiteren sollten Einflussfaktoren in Form des HPV-Tumorstatus, der Vitamin D Versorgung, des UICC-Stadiums, des Alters, der Raucherhistorie und der Primärlokalisierung des Tumors auf die Prognose und die Immunzellinfiltration diverser Immunzellsubtypen untersucht werden. Vor diesem Hintergrund erfolgte eine statistische Analyse von 29 Immunparametern der 513 Patienten umfassenden TCGA-HNSC Kohorte basierend auf öffentlich zugänglichen RNA-Sequenzierungsdaten und Immundekonvolutionsalgorithmen. Durch diese Analysen sollten die prognostisch relevantesten Immunbiomarker des immunologischen TME der Patienten der TCGA-HNSC Kohorte identifiziert und anschließend deren prognostische Relevanz an einem eigenen Patientenkollektiv bestehend aus 101 an der HNO-Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes behandelten HNSCC-Patienten durch immunhistochemische Analysen validiert werden. So sollten auf der Grundlage dieser Arbeit prognostische Marker identifiziert werden, die vielversprechende Zielstrukturen für zukünftige Immuntherapien darstellen könnten, um so potentielle Ansätze aufzuzeigen, wie die Prognose von HNSCC-Patienten verbessert werden könnte.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Patientenmaterial

In dieser Arbeit wurden histologische Schnitte von FFPE-Proben (Formalin fixed paraffin embedded) von 101 HNSSC Patienten immunhistochemisch gefärbt und analysiert. Die Patienten wurden im Zeitraum von 2013 bis 2019 in der Klinik für Hals- Nasen und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum des Saarlandes behandelt. Alle verwendeten FFPE-Proben der Tumorresektate wurden histologisch vom Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des UKS als Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region klassifiziert. Die zugehörigen, in dieser Arbeit anonymisierten Patienten wurden vor der Operation mit Gewebeentnahme darüber aufgeklärt und bestätigten schriftlich, dass nach der klinischen Untersuchung des Gewebes dieses auch zu Forschungszwecken genutzt werden kann. Es wurde im Vorfeld der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen ein positives Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes eingeholt (Kennziffer 280/10). Die folgenden Tabellen eins, zwei und drei zeigen die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben, verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben, sowie die verwendeten Primärantikörper mit Herstellerangaben.

##### 3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben**

Abimed, Düsseldorf	Gilson-Pipetten
B. Braun, Melsungen	Aqua
Carl Zeiss AG Oberkochen	Durchlichtmikroskop, 4316184
Dako GmbH, Glostrup, Dänemark	REAL™DetectionSystemAlkalinePhosphatase/RED
Eppendorf, Hamburg	Tischzentrifuge (Centrifuge 5415)
Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig	SuperFrost Objektträger
IKA, Staufen	Magnetrührer Combimag RCT
Integra Biosciences, Biebertal	Pipetboy acu
Leica Microsystems, Wetzlar	Rotationsmikrotom SM2400; Rotationsmikrotom RM2125RT
MMM, Medcenter Einrichtungen GmbH, P lanegg	Wärmeschrank, Inucell
Medax Nagel GmbH, Kiel	Wasserbad, Medax Typ WB24
Merck, Darmstadt	Entellan, Art. 1.07961.0500
Panasonic, Hamburg	Mikrowelle, Dimension4

R.Langenbrick, Emmendingen	Deckgläser
R.Langenbrick, Emmendingen	Objektträger
Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen	Reagens-Transfer-Prozessor, Tissue-Tek®VIP™5Jr
Sarstedt, Nümbrecht	Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße(1,5ml, 2ml)
Sartorius, Göttingen	Feinwaagen BP 61, BP 4100
Schleicher und Schüll, Dassel	Filterpapier, DE81
Scientific Industries, Bohemie N.Y., USA	Vortex-Mixer (Genie2™)
Tefal S.A.S, Rumilly, Frankreich	RK1101 Reiskocher
ThermoShadon GmbH, Frankfurt a.M.	Einbettungsgerät, Histocentre2
WTW, Weilheim	pH-Meter, pH 197

### 3.1.3 Chemikalien

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben**

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Art. A9418
Ethanol, 100 %	Merck, Art. 8187601000
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Art. MHS32-1L
PBS pH 7,4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA; Art. 10010023
Trizma® Base	Sigma, Art. 061M5400V
Tween®20	Merck, Darmstadt; Art. 817072
Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Art. 09208831

### 3.1.4 Primärantikörper

**Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper mit Herstellerangaben**

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung (IHC)
Anti CD4	monoklonal	Maus: Clone 4B12 Thermo Fisher, USA Art. MA5-12259	1:35
Anti CD20	monoklonal	Maus: clone L26 Abcam, UK Art. ab9475	1:450
Anti CXCR5	polyklonal	Kaninchen: Abcam, UK Art. ab46218	1:1500
Anti CD3	monoklonal	Kaninchen: clone SP7 Thermo Fisher, USA Art. RM-9107	1:300
Anti CD68	monoklonal	Maus: clone KP1 Abcam, UK Art. Ab955	1:200
Anti FoxP3	monoklonal	Maus Abcam, UK Art. ab22510	1:125
Anti CD8	polyklonal	Kaninchen Abcam, UK Art. ab4055	1:800

### 3.1.5 Sekundärantikörper

Zur Detektion der Primärantikörper in den immunhistochemischen Färbungen wurde in der vorliegenden Arbeit das „Dako REAL™DetectionSystemAlkalinePhosphatase/RED“ verwendet. Als Sekundärantikörper dienen diesem Set biotinylierte Antikörper sowie eine Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase. Im Zuge der Doppelfärbung wurde des Weiteren das REAL™DetectionSystemAlkalinePhosphatase/BROWN und somit ein HRP-Polymer als Sekundärantikörper genutzt.

## 3.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie bezeichnet eine Methode zur Lokalisierung und Visualisierung von Proteinen in Gewebeschnitten. Zugrundeliegend hierbei ist eine Antigen- Antikörper Reaktion. Ausgangsmaterial der Immunhistochemie sind Gewebeproben in Form sogenannter FFPE- (Formalin fixiertes Paraffin eingebettetes Gewebe) Blöcke. Mithilfe des Leica RM 2235 Rotationsmikrotoms (Leica Microsystems,



Wetzlar) wurden die oben genannten FFPE-Blöcke zu Schnitten mit einer Dicke von 3 Mikrometern verarbeitet und auf Superfrost Ultra Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) aufgetragen. Durch die Einbettung in Paraffin wird die Proteinstruktur der Präparate modifiziert, was in einer reduzierten Affinität der Antigene resultiert. Durch verschieden konzentrierte Ethanol- Bäder zur Rehydrierung sowie einer Entparaffinierung mittels Xylol, wird die Grundbeschaffenheit des Präparats für die nachfolgende Methodik vorbereitet. Um der zuvor angesprochenen reduzierten Affinität der Antigene entgegenzuwirken und eine optimale Zugänglichkeit der Proteinstrukturen für folgende Antikörperinkubationen zu ermöglichen, unterzieht man die Schnitte einer Demaskierung durch ein Wasserbad in einem Retrieval Puffer. Hierbei ist die Hitze des Wasserbads der entscheidende Faktor für die Reversibilität der Affinität der Antigene. Nach Wiederherstellung der molekularen Reaktivität erfolgt eine Inkubation mit dem so genannten Primärantikörper der antikörperspezifisch an seine Zielstruktur der Zelle, das Epitop, bindet. Um eine Visualisierung des Proteins zu gewährleisten und gleichzeitig das Signal des Primärantikörpers zu verstärken, erfolgt dann eine Inkubation mit dem sogenannten Sekundärantikörper. Als letzte Reaktion erfolgt die eigentliche Visualisierung durch die enzymgekoppelte Reaktion mit einem Chromogen. Alle während des Färbeprozess verwendeten Lösungen sind in Tabelle 4 dargestellt. Detaillierte Angaben zum exakten Verlauf der Immunhistochemie folgen in den weiteren Kapiteln.

**Tabelle 4: Verwendete Lösungen der allgemeinen Immunhistochemieprotokolle**

Verwendete Lösungen	Zusammensetzung
Tris-EDTA Retrievalpuffer; pH 9,0:	296,4 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 3,0 ml 1 M Tris-Lösung 600 µl 0,5 M EDTA-Lösung
0,5 M EDTA-Lösung; pH 8,0:	93,06 g EDTA 300 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
1 M Tris-Lösung:	12,11 g Tris-Base 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
5% BSA in PBS (pH 7,2):	200ml PBS 10g BSA
3% BSA in PBS (pH 7,2):	200 ml PBS 6 g BSA
1% BSA in PBS (pH 7,2):	200 ml PBS 2 g BSA
5% BSA in PBS (pH 7,2) mit Tween20:	200ml PBS 10g BSA 0,1 % Tween20
1% BSA in PBS (pH 7,2) mit Tween20:	200ml PBS 2g BSA 0,1% Tween20

### 3.2.1 Gewebepräparation und Fixierung

Zur Herstellung der oben genannten FFPE-Schnitte wurden die Proben des Patientengewebes in PBS-gepuffertes 4%iges Formalin überführt. Die Einbettung des so über mehrere Stunden fixierten Gewebes

wurde unter zu Hilfenahme des Reagenz-Transfer-Prozessors Tissue-Tek®VIP™5 JR semi-automatisiert durchgeführt. Die folgende Tabelle fünf zeigt die einzelnen Arbeitsschritte des Prozessors.

**Tabelle 5: Arbeitsschritte des Reagenz-Transfer-Prozessors Tissue- Tek®VIPTM5 Jr zur Einbettung von Formalin-fixiertem humanem Gewebe in Paraffin.**

Reagenz	Dauer [h]	Temperatur [°C]
4%-iges Formalin/1xPBS	2,0	45
70%-iges Ethanol	0,5	40
70%-iges Ethanol	1,0	40
70%-iges Ethanol	1,0	40
96%-iges Ethanol	0,5	40
99%-iges Ethanol	1,0	40
99%-iges Ethanol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Paraffin	0,5	60
Paraffin	0,5	60
Paraffin	1,0	60
Paraffin	1,0	60

Von den so hergestellten FFPE-Blöcken wurden anschließend mit dem Leica RM 2235 Rotationsmikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar) 3 Mikrometer dicke Gewebeschnitte angefertigt und in einem warmen Wasserbad, unter Streckung mithilfe eines Pinsels, auf Superfrost Ultra Plus Objektträger aufgebracht. Diese Schnitte wurden dann bei Raumtemperatur dunkel gelagert und vor dem entsprechenden Färbetag über Nacht in einen 37 Grad Celsius warmen Wärmeschrank gestellt.

### 3.2.2 Versuche zur Etablierung der Standardfärbeprotokolle

Vor der Färbung der Schnitte des HNSCC- Patientenkollektivs war eine Etablierung des Färbeprotokolls an institutseigenen Tonsillen- sowie Plattenepithelkarzinompräparaten nötig. Das standardisierte Färbeprotokoll hierzu lieferte Dr. rer. nat. Florian Bochen (Forschungslabor der HNO-Klinik, Universität des Saarlandes). Basierend auf dem Standardprotokoll als Vorlage wurde die Modifikation der einzelnen Teilschritte für jeden verwendeten Primärantikörper in mehreren Etablierungsversuchen getestet, um so die ideale Antikörperverdünnung und Demaskierungszeit zu bestimmen. Im Verlauf der Etablierung zeigten sich zunächst bei Verwendung des Standardprotokolls mit einer Verdünnung des Primärantikörpers nach Empfehlung des Herstellers einige antikörperabhängige Probleme, wie

unspezifische Hintergrundfärbung oder Intensitätsschwankungen in Form zu starker oder zu schwacher Färbung. Zur Vermeidung dieser Problematik wurde zuerst die Demaskierung in Bezug auf die 20-minütige Herstellerangabe verändert. Antikörperabhängig wurde die Zeit systematisch herabgesetzt, mit dem Ziel weniger unspezifische Färbereaktionen zu erlangen. Um das Färbeergebnis weiter zu optimieren, wurden auch die Antikörperverdünnungen verändert. Zu beobachten war auch hier im finalen Färbeprotokoll für die einzelnen Antikörper eine signifikante Differenz zur Herstellerangabe. So veränderte sich die Verdünnung im Laufe der Etablierung bei CD4 von initial 1:50-1:100 auf 1:35, bei CD20 von initial 1:100-1:400 auf 1:450 und bei CXCR5 von initial 1:500-1:2000 auf 1:1500. Erwähnenswert hierbei sei die Problematik bei Anti-CXCR5 und Anti- CD4, bei denen eine titrationsabhängige unspezifische Hintergrundfärbung festgestellt werden konnte. Die Lösung im Rahmen dieser beiden Färbungen, war hierfür die Verwendung von 0,1% Tween20 in PBS-Waschpuffern, in der 5 %igen BSA Blockierlösung sowie in der 1% igen Antikörperverdünnung. Grund hierfür war die lipidschichtdurchdringende Wirkung des Tweens20. Folglich kam es zur vermehrten Freilegung spezifischer Epitope, was in einer spezifischeren Färbung resultierte.

Nach erfolgreicher Etablierung der Single-Antikörperfärbungen auf den institutseigenen Materialien (Tonsillen und Plattenepithelkarzinome), erfolgte ein Färbeversuch auf Gewebeschnitten des in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektivs. Ziel hierbei war eine Feinjustierung der Färbeprotokolle, da sich probenabhängige minimale Intensitätsunterschiede zeigten.

Nach Abschluss der Etablierung der Antikörper für Einzelfärbungen wurde eine Etablierung für die immunhistochemischen Doppelfärbungen (CD20 + CXCR5; CD4 + CXCR5) durchgeführt. Ziel der Doppelfärbung war es, durch ein gemeinsames Auftragen zweier Primärantikörper spezifische Subpopulationen der zuvor in Einzelfärbungen detektierten Zellen, nachzuweisen. Hierbei war es nötig die Intensität der Antikörper aufeinander abzustimmen und erneut ein Färbeprotokoll zu erstellen, dass die simultane Detektion beider Epitope erlaubt. Um etwaige Interaktionen der Antikörper untereinander auszuschließen beziehungsweise zu identifizieren, wurden mehrere Färbekonditionen getestet. Im Zuge dessen wurde die Reihenfolge der Antikörperinkubation, das benutzte Färbekit sowie die gemeinsame Demaskierungszeit variiert. Eine weitere Problematik stellte die Verwendung von Tween20 dar, dass zwar im Einzelfärbungsprotokoll von Anti-CXCR5 sowie Anti-CD4 Verwendung fand, jedoch im Falle der Einzeletablierung von Anti-CD20 nicht von Nöten war. Es stellte sich heraus, dass im Falle der Anti CD4- Anti CXCR5 Kombination keine Anpassung des Einzelfärbungsprotokolls notwendig war, anders als bei der Anti CD20- Anti CXCR5 Kombination. Aufgrund zu starker Färbeintensität und verstärkter, unerwünschter Hintergrundfärbung wurde im Falle der CD20-CXCR5 Doppelfärbung auf Tween20 im Bereich der CD20 Teilfärbung verzichtet. Nach erfolgreicher finaler Etablierung der Protokolle wurden die finalen immunhistochemischen Färbungen der HNSCC Schnitte des Patientenkollektivs durchgeführt.

### 3.2.3 Allgemeiner Versuchsablauf der immunhistochemischen Färbungen

#### 3.2.3.1 Versuchsablauf der Einzelfärbung (CD4, CD20, CXCR5)

Nach Inkubation der Schnitte über Nacht in einem 37 Grad Celsius warmen Wärmeschrank erfolgte die antikörperunspezifische Entparaffinierung der FFPE-Schnitte in einer Xylokküvette für 10 Minuten. Darauffolgend wurden die Präparate 3 mal für 30 Sekunden in unterschiedlichen Xylokküvetten gewaschen. Um eine Rehydrierung der Präparate zu gewährleisten, erfolgte anschließend ein dreimaliges Waschen in drei verschiedenen 100%igen sowie drei verschiedenen 70%igen Ethanolküvetten für jeweils 30 Sekunden. Der finale Waschschrift wurde mit  $H_2O_{bidest}$  durchgeführt. Um eine optimale Affinität der Antigene zu erlangen, wurde nun antikörperspezifisch eine im Reiskocher durchgeführte hitzeinduzierte Epitop-Demaskierung durchgeführt. Hierbei wurde der zuvor angesetzte Tris- EDTA Retrievalpuffer (pH 9) in einer Kunststoffküvette bei 900 W und circa 3 min in der Mikrowelle auf über 95 Grad Celsius erhitzt. Die Präparate wurden in diesen Puffer überführt und für eine antikörperspezifische Zeitdauer im Reiskocher demaskiert. Die Demaskierungszeit bei CD20 betrug hierbei 17 Minuten, bei CD4 18 Minuten und bei CXCR5 jeweils 15 Minuten. Nach der Demaskierung im Reiskocher erfolgte eine Abkühlungsphase der Schnitte von 30 min bei Raumtemperatur, um die Temperatur der Schnitte auf unter 50 Grad Celsius zu senken. Anschließend wurden die Präparate für 3x5 Minuten in Waschpuffer (PBS, pH 7,2) gespült.

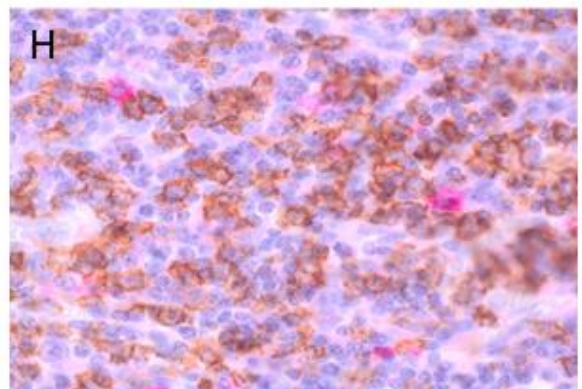
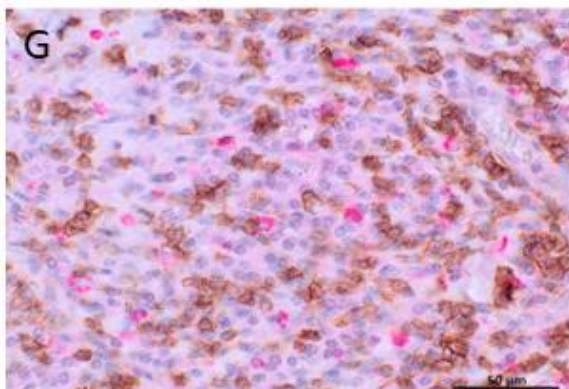
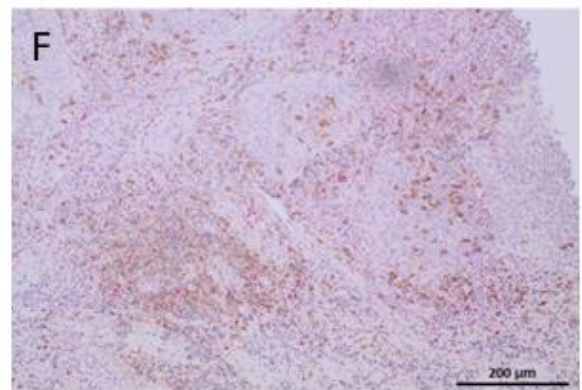
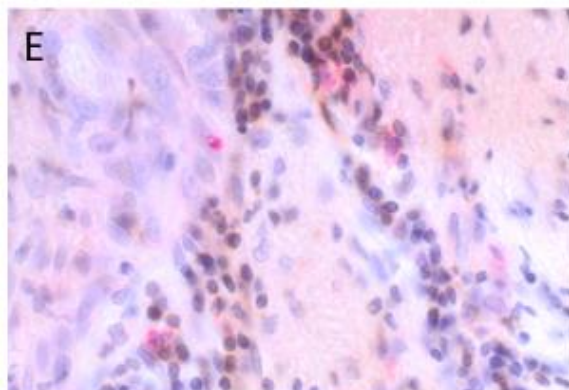
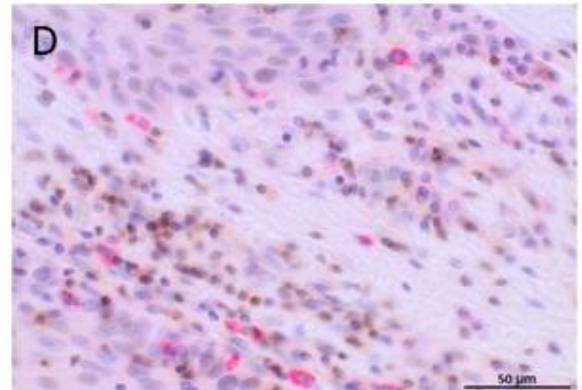
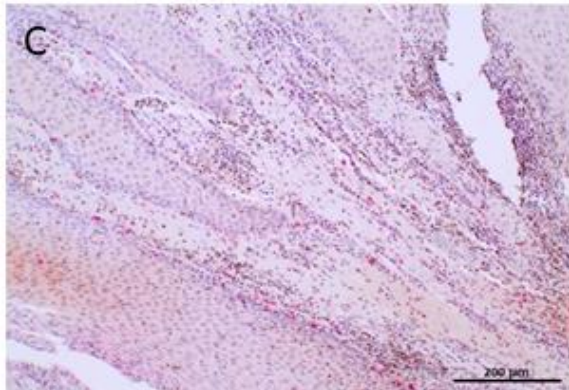
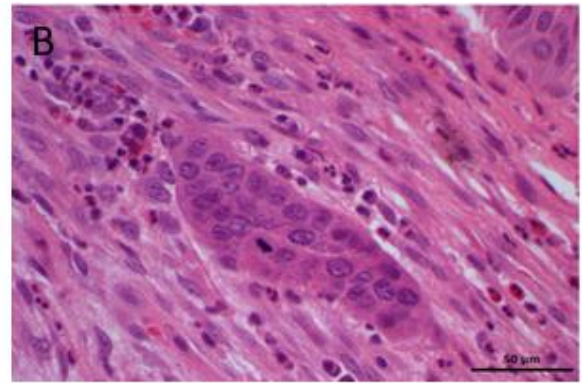
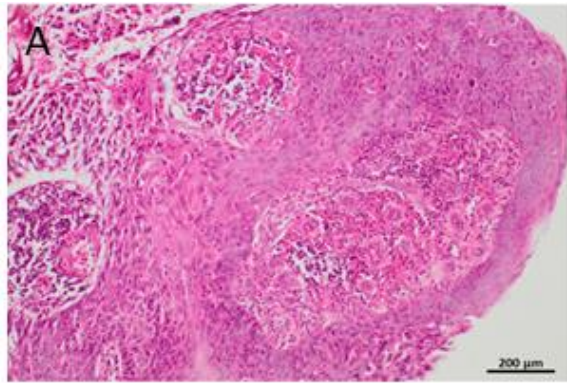
Um unspezifischen Proteinbindungen entgegenzuwirken, wurden anschließend die Schnitte mit 3%igen BSA in PBS, beziehungsweise im Falle der Verwendung von Tween20 mit 5% igen BSA in PBS (pH 7,2) für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (sog. „Blockieren“). Nach Ablauf der Blockierungszeit erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (antikörperspezifisch verdünnt in 1% BSA/PBS (CD4 und CXCR5 mit Tween20), CD4: 1:35, CD20:1:450, CXCR5:1:1500) für 60 Minuten. Zur Visualisierung der mit dem Primärantikörper markierten Antigene wurden nach einem 3x5 minütigem Waschschrift (PBS, pH 7,2;) die Präparate mit einem biotinylierter Sekundärantikörpern aus dem REAL™DetectionSystemAlkalinePhosphatase/RED Färbekit entsprechend den Herstellerangaben für 30 Minuten inkubiert. Auf einen erneuten dreimaligen Waschschrift mit dem PBS Waschpuffer (3x5 Minuten) folgte eine 30-minütige Inkubation mit der Streptavidin-gekoppelten Alkalischen Phosphatase. Bevor die Schnitte dann für 15 Minuten mit der Substrat Chromogen Lösung inkubiert wurden, folgte ein erneuter 3x5 minütiger Waschvorgang mit PBS.

Die abschließenden Spülschritte bestanden aus einem 5-minütigem Waschen mit Aqua dest, einem 7-minütigen Gegenfärben mit Sigma Aldrich Hämatoxylin und einem 10-minütigen Spülvorgang unter fließendem Wasser. Nun erfolgte im Sinne der Dehydratisierung ein 3x 30 Sekunden langes Bad in 70% Ethanol, gefolgt von drei Bädern in 100% Ethanol und einem dreifachen Xylobad mit anschließendem Eindecken der Präparate mit Entellan. Alle PBS haltigen Waschpuffer enthielten im Rahmen der CD4 und CXCR5 Färbung 0,1% Tween20.

### 3.2.3.2 Versuchsablauf der Doppelfärbung (CD20+CXCR5; CD4+CXCR5)

Analog zur Einzelfärbung begann die Doppelfärbung, nach zuvor nächtlicher Inkubation der Schnitte in einem 37 Grad Celsius warmen Inkubator, mit diversen Entparaffinierungs- und Rehydrierungsschritten. Hierzu erfolgte zunächst ein 10-minütiger Waschschriff in einer Xylokküvette. Darauffolgend wurden die Schnitte im Zuge der Rehydrierung jeweils 3-malig für 30 Sekunden in 100%igen und 70%igen Ethanolküvetten gewaschen. Abschließend erfolgte ein weiterer 5-minütiger Waschschriff in  $H_2O_{\text{bidest.}}$ . Um den paraffinbedingten Affinitätsverlust der Epitope auszugleichen, wurde analog zur Einzelfärbung eine hitzeinduzierte Demaskierung im Wasserkocher durchgeführt. Hierfür wurde der Tris- EDTA Retrievalpuffer (pH 9) in einer Kunststoffküvette bei 900 W und circa 3 Minuten in der Mikrowelle auf über 95 Grad Celsius erhitzt und mit den Schnitten in das Wasserbad eines Reiskochers gestellt. Im Zuge der Doppelfärbung wurde die Problematik einer gemeinsamen Demaskierungszeit zweier verschiedener Primärantikörper deutlich. Durch Variieren der Demaskierungszeit wurde abgewogen, wann das optimale Färbergebnis der beiden nacheinander aufgetragenen Primärantikörper entsteht. Im Falle der Anti-CD4 – Anti- CXCR5 Kombination belief sich die Demaskierungszeit auf 16,5 Minuten und im Falle der Anti- CD20 – Anti-CXCR5 Kombination auf 15 Minuten. Um eine Temperatur von unter 50 Grad Celsius zu erreichen, kühlten die Schnitte anschließend eine halbe Stunde bei Raumtemperatur ab. Danach erfolgte drei Mal ein fünfminütiger Waschschriff mit PBS. Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden, wurden die Schnitte dann für 30 Minuten mit 3%igem, beziehungsweise im Falle einer Verwendung von Tween20 mit 5 %igem BSA/PBS inkubiert. Der Inkubation folgend wurde der erste Primärantikörper auf die Präparate aufgetragen. Im Falle der CD4- CXCR5 Kombination erfolgte die Primärantikörperinkubation für 60 Minuten, der CD4- Antikörper in einer Konzentration von 1:35 (verdünnt in 1% BSA/PBS mit Tween20). Für die CD20-CXCR5 Kombination wurde zuerst der CD20 Antikörper in einer 1:450 Verdünnung (verdünnt mit 1%BSA/PBS) für 45 Minuten aufgetragen. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper folgte ein 3x5 minütiger Waschschriff in PBS-Küvetten. Zur Amplifizierung und Visualisierung des Primärantikörpers wurden die Schnitte danach mit einem HRP-Polymer Sekundärantikörper aus dem REAL™DetectionSystemAlkalinePhosphatase/BROWN Färbekit entsprechend den Herstellerangaben inkubiert (60 Minuten). Vor der folgenden fünfminütigen Inkubation der Schnitte mit der Substrat Chromogen Lösung wurden die Präparate erneut 3-mal in PBS gewaschen. Zur Vorbereitung auf den zweiten Primärantikörper erfolgte, nach einmaligem Waschschriff mit Aqua Dest und PBS, die Blockierung der Schnitte für 30 Minuten mit 5% BSA/PBS mit Tween20. Auf die Blockierung folgend, begann die Inkubation des zweiten Primärantikörpers. Sowohl für die Anti-CD4/ Anti-CXCXR5 als auch für die Anti-CD20/ Anti-CXCXR5 Kombination wurde der CXCR5-Antikörper als zweiter Primärantikörper genutzt. In einer 1% BSA/PBS Verdünnung mit Tween20 wurde der Antikörper für 60 Minuten inkubiert. Es folgten drei Waschriffe zu je fünf Minuten mittels Tween20 enthaltendem PBS. Analog zum ersten Primärantikörper, wurden die Schnitte danach für 30 Minuten mit einem biotynilierten Sekundärantikörper des

REAL™DetectionSystemAlkalinePhosphatase/RED Färbekit inkubiert. Nach erneutem 3-mal fünfminütigem Waschschrift in PBS mit Tween20 wurde die Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase für 30 Minuten auf die Schnitte gegeben. Auf einen anschließenden Waschschrift in PBS mit Tween20 folgte die Visualisierung des zweiten Primärantikörpers mittels der Substrat-Chromogen Lösung für 15 Minuten. Schlussendlich wurden die Schnitte mehreren Spülschritten in Form eines 5-minütigen Waschens mit Aqua dest, eines 7-minütigen Gegenfärbens mit Sigma Aldrich Hämatoxylin und eines 10-minütigen Spülvorgangs unter fließendem Wasser unterzogen. Im Sinne einer Dehydratisierung erfolgte ein 3x 30 Sekunden langes Bad in 70% Ethanol, gefolgt von drei Bädern in 100% Ethanol und einem dreifachen Xylolbad mit anschließendem Eindecken der Schnitte mit Entellan. Beispielhafte Färbeargebnisse unter Verwendung der zuvor beschriebenen Protokolle sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Immunhistochemische Analyse der Immunzellsubpopulationen in der Validierungskohorte/ UKS-Kohorte (n=101 Patienten).** Repräsentative HE- und immunhistochemische Färbungen eines Hypopharynxkarzinom-Patienten. (A+B) HE-Färbung in 10x (A) und 40x (B) Vergrößerung. CD4-CXCR5 Färbung (follikuläre T-Helferzellen) in (C)

10x, (D) 40x und (E) 60x Vergrößerung und CD20-CXCR5 Färbung (naive B-Zellen) in (F) 10x (G) 40 x und (H) 60x Vergrößerung. In (C), (D), (E), (F), (G) und (H) wird CXCR5 durch die roten Färbesignale (FastRed) und CD4 bzw. CD20 durch die braunen Färbesignale (DAB) dargestellt.

### 3.2.4 *Semiquantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen*

In die semiquantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen flossen neben der „Immunzellinfiltration“, auch die Parameter „gefärbte Leukozytenzahl“ sowie „Größe des Präparats“ ein. Durch die genannten Parameter konnte so ein modifizierter immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner (REMMELE, STEGNER, 1987) gebildet werden. Der Score wurde für alle durch die Immunhistochemie detektierten Zielzellen und für jedes Präparat sowohl intra- wie auch peritumoral bestimmt. Als intratumoral wurde hierbei der Teil des Präparats mit sichtbaren Tumorzellen, inklusive der direkten Umgebung des Tumors in Form von 3 Zellreihen Abstand gewertet. Als peritumoral wurde das Gewebe charakterisiert, dass per se tumorfrei war und sich innerhalb von drei mikroskopischen Blickfelder angrenzend an den Tumor befand. Die Immunzellinfiltration wurde gemäß ihrem Ausmaß in Kategorien von 1 bis 4 eingeteilt. Kategorie 1 stellt hierbei keine detektierbare Immunzellinfiltration dar. Kategorie 2 definierte sich durch eine Immunzellinfiltration von bis zu 25% der gesamten Präparatefläche. Kategorie 3 umfasste die Präparate deren Immunzellinfiltration 26- 50% der Präparatefläche betrug und Kategorie 4 stellte alle Präparate mit einer Immunzellinfiltration auf > 50% der Präparatefläche dar. Die Analyse der Einzelfärbungen gestaltete sich annähernd analog zur Immunzellinfiltration. Auch hier wurde eine Einteilung in 3 Kategorien vorgenommen. Zu Kategorie 1 zählten hierbei alle Präparate die weniger als 30% positiv gefärbte Leukozyten, gemessen an der Gesamtzahl der Leukozyten im Präparat, aufwiesen. Kategorie 2 stellte den Bereich von 30-60 % positiv gefärbter Leukozyten dar. Zu Kategorie 3 zählten alle Präparate, bei denen mehr als 60% der Gesamtleukozyten im Präparat positiv gefärbt waren.

**Tabelle 6: Zusammensetzung des mIRS im Rahmen der Einzelfärbung.**

<i>Einzelfärbung</i>	<i>Immunzellinfiltration</i>	<i>gefärbte Leukozytenzahl</i>	
<b>1</b>	keine	<30%	
<b>2</b>	<25%	30-60%	
<b>3</b>	25-50%	>60%	
<b>4</b>	>50%	-	
<i>Beispielrechnung:</i>	2	3	mIRS: 2x3=6

Die Analyse der Doppelfärbungen musste im Vergleich zu diesem Vorgehen bei den Einzelfärbungen nochmals modifiziert werden. Hierbei wurde, aufgrund der verhältnismäßig geringen Anzahl an doppelgefärbten Zellen, auf eine prozentuale Kategorieneinteilung verzichtet. Stattdessen wurden die doppelgefärbten Zellen im gesamten Präparat ausgezählt und die Kategorieneinteilung verlief auf Basis absoluter Zahlen. Kategorie 1 stellte hierbei die Spanne von null bis 5 positiv doppelgefärbten Zellen



dar. Kategorie 2 repräsentierte die Präparate mit einer Anzahl von fünf bis fünfzehn Zellen, gefolgt von Kategorie 3 mit einer Anzahl von 16-30 doppeltgefärbten Zellen. Kategorie 4 umfasste alle Präparate mit einer Gesamtzahl von über 30 doppeltgefärbten Zellen. Mit dem Produkt aus Immunzellinfiltration und positiv gefärbten Zellen entstand so im Falle der Einzelfärbung eine Spannbreite des modifizierten IRS von 1-12. Im Falle der Doppelfärbung betrug das mögliche Ergebnis des IRS 1-16.

Um einen durch die Größe des Präparates verursachten Bias bei der Bestimmung des IRS auszuschließen, wurde im nächsten Schritt auch die Größe des Gesamtpräparats für die Bestimmung des modifizierten IRS (mIRS) berücksichtigt. Hierzu wurde das Präparat durch das Leica MSV269 Auflichtmikroskop begutachtet und mithilfe der ImageJ Software die Präparat- sowie Tumorgöße umfahren. Anhand der durch ImageJ generierten Flächen (in mm<sup>2</sup>), konnte so die Tumorgöße bestimmt werden. Das peritumorale Stroma wurde näherungsweise als Differenz der Gesamt-Präparatgröße und der Tumorgöße berechnet. Wie bereits bei den positiven Leukozyten, wurde im Falle der Größe gleichermaßen eine Einteilung in 3 Kategorien vorgenommen. Die Kategorie 1 der Tumorgöße umfasste alle Präparate ab 80 mm<sup>2</sup>. Kategorie 2 umfasste die 16,1 bis 72 mm<sup>2</sup> großen Präparate und Kategorie 3 beinhaltete alle Präparate mit einer Tumorgöße von 0,2 bis 16 mm<sup>2</sup>. Simultan zur Tumorgöße, wurde auch das peritumorale Stroma kategorisiert. Hierbei beinhaltete Kategorie 1 alle Präparate mit einer Größe von 147,2 bis 293,1 mm<sup>2</sup>, Kategorie 2 alle Präparate der Größen von 31 bis 126,4 mm<sup>2</sup> und Kategorie 3 die Präparate mit einer Größe von 0,1 bis 30 mm<sup>2</sup>. Die verschiedenen Kategorien der Größe wurden daraufhin mit dem zuvor berechneten IRS multipliziert, resultierend in dem finalen „modifizierten IRS“ (mIRS). Als Endergebnis war somit eine Spannbreite des mIRS von 1 bis 48 im Falle der Doppelfärbung und von 1 bis 12 im Falle der Einzelfärbung möglich. Tabelle sechs und sieben veranschaulichen die Zusammensetzung des mIRS im Rahmen der Einzel- und Doppelfärbung nochmals. Mittels der zuvor erläuterten Vorgehensweise wurden alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten immunhistochemischen Färbungen am Durchlichtmikroskop von drei unabhängigen Begutachtern, davon ein Facharzt für Pathologie, semiquantitativ ausgewertet.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des mIRS im Rahmen der Doppelfärbung**

<i>Doppelfärbung</i>	<i>Immunzellinfiltration</i>	<i>gefärbte Leukozyten (Stück)</i>	<i>Größe Präparat (intratumoral)</i>	<i>Größe Präparat (peritumoral)</i>	
1	keine	0-5	>80 mm <sup>2</sup>	147,2-293 mm <sup>2</sup>	
2	<25%	6-15	16,1-72 mm <sup>2</sup>	31-126,4 mm <sup>2</sup>	
3	25-50%	15-30	0,2-16 mm <sup>2</sup>	0,1-30 mm <sup>2</sup>	
4	>50%	>30	-	-	
<i>Beispielrechnung intratumoral:</i>	2	3	2	-	mIRS: 2x3x2=12

### 3.3 Analyse der TCGA-Sequenzierungsdaten

Für die Analysen des TCGA-HNSC Kollektivs im ersten Teilabschnitt dieser Arbeit wurden öffentlich zugängliche DNA-Sequenzierungsdaten des TCGA-Projekts (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) genutzt (zur näheren Beschreibung des TCGA-Projekts s. Einleitung Kapitel 2.3).

Hierbei wurde ein HNSCC Patientenkollektiv von n=513 Patienten ausgewertet (im TCGA-Projekt kodiert als TCGA-HNSC). Das Patientenkollektiv setzt sich aus diversen Tumorentitäten der Kopf-Halsregion, angeführt von Karzinomen der Mundhöhle (n=309), Larynxkarzinomen (n=116), Oropharynxkarzinomen (n=78), sowie Hypopharynxkarzinomen (n=10) zusammen. Für die Auswertung von Immuninfiltration und Immunaktivität im Zuge der Analyse der Tumorresektate der Patienten des TCGA-Kollektivs wurden diverse Methoden, basierend auf short read RNA-Sequenzierungsdaten (srRNAseq) und DNA-Sequenzierungsdaten (whole exome sequencing, WES), verwendet: Zum einen wurde die „Single-Sample Gene Set Enrichment Analysis“ Methode (ssGSEA) (ROONEY et al., 2015; THORSSON et al., 2018) angewendet, die am Broad Institut (Cambridge, MA, USA) auf Basis der GSEA Plattform entwickelt wurde. ssGSEA errechnet unter Verwendung von RNAseq Daten einer Probe sogenannte Anreicherung-Scores für vordefinierte genetische Pathways (gene set enrichment scores). Dies ermöglicht die Analyse ob in einer Probe bestimmte Gensets auf mRNA-Ebene verstärkt oder vermindert exprimiert werden und damit eine Aussage darüber, welche molekularen Pathways stimuliert und welche supprimiert sind.

Ein weiterer Algorithmus zur Analyse der Immuninfiltration und Immunaktivität stellt die „Estimation of Stromal and Immune Cells in Malignant Tumor Tissues using Expression Data (ESTIMATE)“ (ROONEY et al., 2015; THORSSON et al., 2018) dar. ESTIMATE wurde auf Basis von ssGSEA am MD Anderson Cancer Center in Houston (TX, USA) entwickelt und integriert öffentliche Datenbanken sowie die Datenbank des TCGA. Aus verschiedenen Tumorproben mit starker und schwacher Immunzellinfiltration wurden hierbei 141 relevante Gene definiert, deren Expressionsdaten entweder zu einem „stromal score“ oder einem „immune score“ kombiniert werden können. Der „ESTIMATE Score“ beschreibt eine Kombination beider Einzelscores, der die Expressiondaten aller 141 Gene einschließt. Die ESTIMATE Score Daten für das TCGA-Projekt sind auf der Website des MD Anderson Cancer Center öffentlich zugänglich ([bioinformatics.mdanderson.org/estimate](http://bioinformatics.mdanderson.org/estimate)).

Zur Beurteilung der zytolytischen Aktivität der den Tumor infiltrierenden Immunzellen wurde der sog. „CYT score“ verwendet, der erstmals von Rooney et al. beschrieben wurde und auf der Expression der beiden Effektorgene Granzym A (GZMA) und Perforin (PRF1) basiert (ROONEY et al., 2015).

Mithilfe der von Thorsson und Rooney entwickelten Methodik konnten so 29 verschiedene „Immunmarker“ des TCGA-HNSC-Patientenkollektiv analysiert werden, die sowohl verschiedene Immunzellpopulationen als auch u.a. Cytokine und Checkpoint-Moleküle einschließen: CD8+ T-Zellen, aktivierte CD4+ Gedächtnis-T Zellen, ruhende CD4+ Gedächtnis T Zellen, naive CD4+ T-Zellen, folliculäre T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen, Lymphozyten als Gesamtpopulation, Leukozyten als Gesamtpopulation, Gedächtnis B-Zellen, naive B-Zellen, eosinophile Granulozyten, IFN-gamma,

TGF-beta, TH1 Zellen, TH2 Zellen, TH17 Zellen, M1 Makrophagen, M2 Makrophagen, M0 Makrophagen, Makrophagen als Gesamtpopulation, Mastzellen, Monozyten, neutrophile Granulozyten, Plasmazellen, aktivierte NK Zellen, ruhende NK Zellen, dendritische Zellen als Gesamtpopulation, aktivierte dendritische Zellen und ruhende dendritische Zellen. Im Falle der „Leukozyten-Fraktion“ wurde der Leukozytengehalt zuerst ermittelt, indem die methylierten DNA-Proben mit der größten Differenz zwischen reinen Leukozyten und normalem Gewebe identifiziert wurden. Darauf basierend beruht die anschließende Schätzung des Leukozytengehalts mithilfe eines „Mixture Models“. Um die verschiedenen Immunzell-Subtypen innerhalb des Leukozyten Kompartiments zu bestimmen, wurden CIBERSORT Algorithmen (cell-type identification by estimating relative subsets of RNA transcripts) (NEWMAN et al., 2015) verwendet. Zur Entwicklung der CIBERSORT Algorithmen wurden 22 Immunzell-Referenzprofile benutzt, um eine Basissignaturmatrix abzuleiten. Diese können so bei gemischten Proben verwendet werden, um die relativen Anteile der Immunzellen zu bestimmen. Die klinischen Daten der TCGA-HNSC-Patienten wie u.a. das „Overall Survival (OS)“, „Progression free survival (PFS)“ sowie weitere klinische Daten und TNM-Klassifizierungen lieferte die öffentlich zugängliche FIREBROWSE Datenbank (<http://firebrowse.org/>). Die Daten zur Analyse histopathologischer Charakteristika, wie dem HPV-Tumorstatus, lieferten die Veröffentlichungen von *Thorsson et al.*, sowie *Campbell et al.* (CAMPBELL et al., 2018; THORSSON et al., 2018).

### 3.4 Analyse der Immunhistochemie

In den nachfolgenden Tabellen 8 und 9 sind die aufgelisteten Patienten weiter in eine Gruppe mit Vitamin-D-Mangel und eine Gruppe mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung unterteilt, für die jeweils das Alter bei Erstdiagnose, die Tumorlokalisation, das TNM-Stadium, der 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel und der HPV-Tumorstatus aufgelistet sind.

#### 3.4.1 Patienten mit einem Vitamin D Mangel

**Tabelle 8: Patientendaten der UKS-Patienten mit Vitamin D Mangel**

Geschlecht	Alter bei Erstdiagnose	Diagnose	TNM- Stadium	25-OH-Vitamin-D [ng/ml]	HPV-Status
m	60	Hypopharynx-CA	cT2 cN0 cM0 G2	4,00	negativ
m	53	Hypopharynx-CA	cT4 cN2b cM0 G3	4,00	negativ
m	66	Larynxkarzinom	cT4b cN3b cM0 G2	4,00	negativ
m	61	Larynxkarzinom	cT2 pN0 cM0 G3	4,00	negativ
m	79	Oropharynx-CA	pT1 pN1 cM0 G3	4,00	negativ
m	70	Oropharynx-CA	cT3 cN2c cM0 G2	4,00	negativ
w	64	Oropharynx-CA	pT4a pN2c cM0 G3	4,00	negativ
w	68	Hypopharynx-CA	cT3 cN0 cM0 G2	4,20	negativ
m	58	Hypopharynx-CA	pT4a pN2c cM0 G3	4,80	negativ

w	67	Larynx-CA	pT1a cN0 cM0 G3	4,80	negativ
m	68	Larynx-CA	cT4 pN2c cM0 G2	4,80	negativ
m	67	Larynx-CA	cT3 G3	5,00	negativ
m	59	Mundhöhlen-CA	cT3 cN1 cM1 G2	5,30	negativ
m	55	Oropharynx-CA	cT4 cN2c cM0 G2	5,30	negativ
m	59	Mundhöhlen-CA	pT2 pN3 cM0 G2	5,40	negativ
m	55	Oropharynx-CA	pT1 pN1 cM0 G2	5,40	positiv
m	71	Mundhöhlen-CA	cT4a cN2c cM0 G2	5,40	negativ
m	71	Larynx-CA	pT2 cN2b cM0 G2	5,50	negativ
m	68	Hypopharynx-CA	pT4a pN1 cM0 G2	5,60	negativ
w	56	Oropharynx-CA	cT3 pN1 cM1 G3	5,60	positiv
w	66	Hypopharynx-CA	cT2 cN3 cM0 G2	5,80	negativ
m	57	Larynx-CA	cT2 cN0 cM0 G2	5,80	negativ
m	67	Mundhöhlen-CA	pT1 pN0 cM0 G2	5,80	negativ
m	71	Oropharynx-CA	cT3 cN2 cM0 G3	5,80	positiv
m	50	Larynx-CA	cT2 pN1 cM0 G2	5,90	negativ
m	58	Mundhöhlen-CA	cT1 pN0 cM0 G3	5,90	negativ
m	42	Mundhöhlen-CA	rcT4b cN0 cM0 G3	6,00	negativ
m	48	Mundhöhlen-CA	pT3 pN0 cM0 G2	6,10	negativ
m	56	Mundhöhlen-CA	pT2 pN1 cM0 G2	6,20	negativ
m	74	Larynx-CA	pT4a pN2c cM0 G3	6,50	negativ
m	80	Larynx-CA	cT4 cN0 cM0 G2	6,60	negativ
m	56	Larynx-CA	cT4a pN1 cM0 G2	6,60	negativ
m	69	Larynx-CA	cT2 pN2b cM0 G3	6,70	negativ
m	63	Larynx-CA	pT3 pN3b cM0 G3	6,80	negativ
m	74	Larynx-CA	cT2 cN0 cM0 G2	7,60	negativ
m	59	Hypopharynx-CA	cT4 cN2b cM0 G2	7,80	negativ
w	53	Hypopharynx-CA	pT1 pN0 cM0 G3	7,80	negativ
m	64	Larynx-CA	cT3 pN0 cM0 G2	7,80	negativ
m	53	Oropharynx-CA	cT4 cN2c cM0 G3	7,80	negativ
m	63	Oropharynx-CA	pT1 pN2b pM1 G3	8,00	negativ
m	58	Oropharynx-CA	cT3 pN2b cM0 G3	8,00	negativ
m	60	Larynx-CA	cT3 cN0 cM0 G2	8,20	negativ
w	53	Oropharynx-CA	pT2 pN2b cM0 G3	8,29	negativ
m	57	Oropharynx-CA	rcT2 cN0 cM0 G2	8,40	negativ
m	65	Oropharynx-CA	cT4b cN3 cM1 G3	8,50	negativ
m	75	Hypopharynx-CA	cT2 pN0 cM0 G3	8,60	negativ
m	73	Oropharynx-CA	cT4 cN2b cM0 G3	8,70	negativ
m	64	Mundhöhlen-CA	cT2 cN0 cM0 G1	8,80	negativ
m	49	Oropharynx-CA	cT2 pN2b cM0 G3	8,86	negativ
m	71	Larynx-CA	pT2 pN2b cM0 G2	9,00	negativ
m	57	Oropharynx-CA	pT2 pN2c cM0 G2	9,10	negativ
m	65	Larynx-CA	cT1a cN0 cM0 G1	9,20	negativ

m	60	Larynx-CA	cT2 cN2b cM0 G1	9,30	negativ
m	53	Hypopharynx-CA	pT2 pN2b cM0 G3	9,90	negativ

3.4.2 Patienten mit ausreichender Vitamin D Versorgung **Tabelle 9: Patientendaten der UKS-**

**Patienten mit ausreichender Vitamin D Versorgung**

Geschlecht	Alter bei Erstdiagnose	Diagnose	TNM- Stadium	25-OH-Vitamin-D [ng/ml]	HPV-Status
m	63	Oropharynx-CA	pT2 pN1 cM0 G3	10,80	negativ
m	63	Oropharynx-CA	cT2 pN1 cM0 G3	11,20	positiv
m	59	Larynx-CA	cT2 pN0 cM0 G3	11,60	negativ
m	59	Oropharynx-CA	cT2 cN2 M0 G2	11,80	positiv
m	52	Larynx-CA	pT2 pN0 cM0 G2	11,90	negativ
m	57	Larynx-CA	pT3 pN2b cM0 G2	12,60	negativ
m	66	Oropharynx-CA	cT2 cN0 cM0 G3	13,20	positiv
m	63	Oropharynx-CA	pT2 pN1 cM0 G3	14,40	positiv
m	71	Mundhöhlen-CA	cT2 pN1 cM0 G3	15,70	negativ
w	54	Mundhöhlen-CA	pT2 pN0 cM0 G2	15,80	negativ
m	82	Larynx-CA	cT3 pN1 cM0 G3	16,10	negativ
w	58	Oropharynx-CA	cT4 pN2c cM0 G3	16,50	negativ
m	42	Oropharynx-CA	cT3 cN0 cM0 G2	16,80	negativ
m	79	Oropharynx-CA	cT3 cN3 cM0 G3	17,50	positiv
m	64	Oropharynx-CA	cT4 cN0 cM0 G3	18,50	negativ
m	74	Larynx-CA	cT3 cN0 cM0 G3	18,70	negativ
w	33	Mundhöhlen-CA	pT2 pN1 cM0 G2	18,70	negativ
m	84	Mundhöhlen-CA	pT2 pN2b cM0 G3	18,80	negativ
m	66	Oropharynx-CA	cT2 pN1 cM0 G3	19,40	positiv
m	73	Oropharynx-CA	cT2 cN1 cM0 G3	19,60	positiv
m	72	Oropharynx-CA	cT2 cN3 cM0 G3	19,70	positiv
m	61	Oropharynx-CA	cT3 cN1 cM0 G2	19,80	positiv
m	42	Oropharynx-CA	cT1 cN0 cM0 G3	20,90	negativ
m	80	Oropharynx-CA	cT3 cN2b cM0 G3	21,10	negativ
m	80	Oropharynx-CA	cT1 pN1 cM0 G3	21,50	positiv
w	65	Oropharynx-CA	cT1 pN0 cM0 G3	21,60	positiv
m	65	Larynx-CA	pT4a pN2c cM0 G2	21,80	negativ
m	78	Larynx-CA	cT3 cN0 cM0 G2	22,10	negativ
w	63	Oropharynx-CA	cT4 pN2c cM0 G2	22,10	negativ
w	47	Mundhöhlen-CA	pT1 pN0 cM0 G2	22,80	negativ
m	75	Oropharynx-CA	pT3 pN1 cM0 G3	23,40	positiv
m	51	Mundhöhlen-CA	cT2 pN2b cM0 G2	24,00	negativ
m	72	Oropharynx-CA	ypT1 pN0 cM0 G2	24,20	negativ
m	61	Hypopharynx-CA	cT3 pN3b cM0 G3	24,80	negativ
m	80	Oropharynx-CA	pT2 pN1 cM0 G3	25,10	positiv
m	56	Mundhöhlen-CA	cT1 cN0 cM0 G2	25,20	negativ
m	60	Oropharynx-CA	pT3 pN0 cM0 G2	26,30	negativ

m	73	Larynx-CA	pT1 cN0 cM0 G2	26,40	negativ
w	61	Oropharynx-CA	cT4 cN2c cM1G3	28,70	negativ
m	60	Oropharynx-CA	pT2 pN2 cM0 G3	29,60	positiv
w	87	Oropharynx-CA	cT2 cN0 cM0 G2	29,90	negativ
m	65	Larynx-CA	cT1a cN0 cM0 G2	31,10	negativ
m	72	Mundhöhlen-CA	pT2 pN2b cM0 G3	31,10	negativ
w	79	Mundhöhlen-CA	pT2 pN0 cM0 G2	33,30	negativ
w	59	Mundhöhlen-CA	pT2 cN0 cM0 G3	38,20	negativ
m	54	Hypopharynx-CA	cT4 cN0 cM0 G3	38,80	negativ
m	61	Oropharynx-CA	pT1 pN1 cM0 G2	40,80	positiv

Die unterschiedliche Darstellung des TNM-Stadiums mit klinischen oder pathologischen Angaben des T-Stadiums erklärt sich durch die Tatsache, dass nicht alle Patienten in Form einer primär operativen Therapie behandelt wurden, sondern eine primäre Radio(chemo-)therapie erhielten. Das pathologische (p) T-Stadium konnte nur angegeben werden, wenn eine komplette Tumoresektion erfolgte und somit auch die Tumorgöße durch den Pathologen bestimmt werden konnte. Bei Patienten, die mit einer primären Radio(chemo-)therapie behandelt wurden, konnte das T-Stadium nur klinisch (c) bzw. radiologisch eingeschätzt werden. Das N-Stadium wurde pathologisch klassifiziert, sobald eine Neck-Dissection durchgeführt wurde, ansonsten erfolgte die Einteilung anhand der klinisch/radiologischen Untersuchungen.

### 3.4.3 HPV-Status der UKS-Kohorte

Der HPV-Tumorstatus der institutseigenen Kohorte wurde durch eine Kombination aus immunhistochemischer p16-Färbung und HPV-DNA-PCR ermittelt. Nur Patienten, die sowohl eine positive p16-IHC als auch eine positive HPV-DNA-PCR aufwiesen, wurde ein positiver HPV-Tumorstatus zugeordnet. Im Rahmen der HPV-DNA-PCR wurde die DNA aus frisch eingefrorenem Tumorgewebe mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Anschließend wurde eine HPV-DNA-PCR mit dem LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) unter Verwendung von GP5+/6+-Primern durchgeführt (DE RODA HUSMAN et al., 1995). Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden sowohl mittels SYBR Green wie auch mit einer Gelelektrophorese nachgewiesen. Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 95°C für 15 min wurden 45 PCR-Zyklen mit einer Denaturierung bei 95°C für 10 s, einem Annealing bei 45°C für 5 s und einer Elongation bei 72°C für 18 s durchgeführt. Nach der Amplifikation der PCR-Produkte wurde eine Schmelzkurvenanalyse mit Temperaturen zwischen 45°C und 95°C mit einem Temperaturanstieg von 0,2°C/s durchgeführt. Jede PCR-Analyse umfasste eine HPV16-Positivkontrolle (Tm 79°C) und eine HPV18-Positivkontrolle (Tm 82°C). Zusätzlich wurde das Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)-Gen amplifiziert und als interne Positivkontrolle verwendet (RUPRECHT et al., 2008). Die HPV-DNA-PCR für das UKS-

Kollektiv wurde durch die Mitarbeiter des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt.

Für den immunhistochemischen Nachweis von p16 wurde das CINtec p16 Histologie-Kit (Roche Diagnostics) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Hierbei wurde die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung nach der Entparaffinierung in einem Reiskocher für 20 Minuten unter Verwendung des mitgelieferten Retrievalpuffers durchgeführt. Die Inkubation mit dem p16-Antikörper und der Nachweis der Färbesignale erfolgten gemäß den Empfehlungen des Herstellers. Jede Färbeserie umfasste Negativ- und Positivkontrollen.

### **3.5 Statistische Analysen**

Zur statistischen Auswertung der TCGA-Sequenzierungsdaten und der immunhistochemischen Färbungen wurde die Software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Die Datensätze wurden mittels D'Agostino & Pearson Test, Anderson-Darling Test, Shapiro-Wilk Test, und Kolmogorov-Smirnov Test auf eine Gaußsche Normalverteilung geprüft. Als normalverteilt wurden hierbei nur Datensätze angesehen, die in mindestens zwei der oben genannten Tests als normalverteilt deklariert wurden. Im Falle einer Normalverteilung erfolgte die weitere statistische Analyse mittels parametrischer Tests in Form von: Zweistichproben T-Test, one-way ANOVA mit Tukeys Korrektur für Mehrfachvergleiche und der Pearson Korrelation. Wenn die Daten keine Normalverteilung aufwiesen, wurden nicht-parametrische Tests in Form eines Mann-Whitney-U Tests, one-way ANOVA Tests und Kruskal-Wallis Tests mit Dunns Korrektur für Mehrfachvergleiche sowie der Spearman Korrelation durchgeführt. Die Überlebensstatistik wurde mithilfe eines Mantel-Cox-Test (log-rank-Test) generiert. Hierbei erfolgte eine Einteilung des Patientenkollektivs für die einzelnen in der TCGA-Datenauswertung betrachteten Immunparameter anhand des Medians in die Kategorien „hoch“ (n=257) und „niedrig“ (n=256). Zur Analyse der Überlebenszeiten der Validierungskohorte wurde das Kollektiv anhand des Mittelwerts des mIRS in eine „hoch“ und „niedrig“ Kategorie eingeteilt. Für die immunhistochemischen Überlebensanalysen wurde ebenfalls ein Log-rank (Mantel-Cox) Tests genutzt. Multivarianzanalysen wurden mithilfe einer multinominalen logistischen Regression durchgeführt, wobei das 95%-Konfidenzintervall der jeweiligen Odds Ratio in den jeweiligen Tabellen angegeben ist (siehe Tabelle 11). Es wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  festgelegt, sodass P-Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant gewertet wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Beschreibung der Patientenkollektive

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden RNAseq Daten der TCGA-HNSC Kohorte analysiert. Diese Kohorte umfasste n=513 Patienten mit Karzinomen der Mundhöhle (n=309), Larynxkarzinomen (n=116), Oropharynxkarzinomen (n=78), sowie Hypopharynxkarzinomen (n=10). Das mediane Durchschnittsalter bei Erkrankung betrug 61 Jahre. Das Kollektiv setzte sich zu 74% (n=378) aus männlichen und zu 26% (n=135) aus weiblichen Patienten zusammen. Sieben der 29 in diesem TCGA-HNSC-Kollektiv untersuchten Immunparameter zeigten eine signifikante Korrelation mit einem verbesserten Gesamtüberleben. Infolgedessen erfolgte eine immunhistochemische Validierung der sieben signifikanten Immunparameter der TCGA-Kohorte an institutseigenen Gewebeproben von n=101 Patienten, die an der HNO-Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes behandelt wurden (Validierungskohorte, Synonym: UKS-Patientenkollektiv). Das UKS eigene Kollektiv bestand zu 83 % aus männlichen Patienten und zu 17 % aus weiblichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 63,35 Jahren. Die häufigste Tumorlokalisation in der Validierungskohorte stellte das Oropharynxkarzinom mit n=42 Patienten dar. Weiterhin waren Larynxkarzinome (n=28), Mundhöhlenkarzinome (n=19), sowie Hypopharynxkarzinome (n=12) Teil des Kollektivs. 44% der Patienten des Kollektivs wurden dem UICC Stadium IV (8. TNM-Version) zugeordnet. Die am häufigsten durchgeführte Therapie stellte mit 28% die primäre Operation dar. Anhand ihrer unterschiedlichen Vitamin-D Serumkonzentrationen wurde das Kollektiv in Vitamin- D Mangel Patienten und Patienten mit ausreichender Vitamin-D Versorgung unterteilt. Als Trennkriterium galt hierfür eine Vitamin-D Serumkonzentration von 10 ng/ml. Folglich wurden n= 54 Patienten aufgrund einer Serumkonzentration < 10 ng/ml dem Vitamin-D Mangelkollektiv zugeordnet. Dem entgegen standen n= 47 Patienten mit ausreichender Vitamin-D Versorgung. Die mittlere Nachbeobachtungszeit der Patienten betrug 24 Monate. Neben prognostischen Analysen in Form von Kaplan Meier Kurven, erfolgten Untersuchungen klinischer und histopathologischer Charakteristika, wie dem HPV-Tumorstatus, dem Alter, Tabakkonsum und dem Vitamin D-Serumspiegel beider Patientenkollektive. Bezüglich des HPV-Tumorstatus wurden in der TCGA-Kohorte drei verschiedene Methoden zur Bestimmung des HPV-Status genutzt: p16 Immunhistochemie (n=111, 73 negativ, 38 positiv), HPV-DNA in situ Hybridisierung (ISH; n= 86; 65 negativ, 21 positiv), und PanCancer seq Daten (n=513, 433 negativ, 80 positiv) (CAMPBELL et al., 2018). In der Validierungskohorte (n=101) hingegen wurde HPV-Positivität nur bei vorliegender Kombination aus positiver HPV-DNA-PCR und positiver p16 Immunhistochemie angenommen. Hierbei waren 82 % der Patienten HPV-negativ (n=83) und 18 % der Patienten HPV-positiv (n=18). Einzelheiten zu den epidemiologischen und klinischen Daten der Patienten der Validierungskohorte sind in Tabelle 10 unter 4.1.1. aufgeführt.



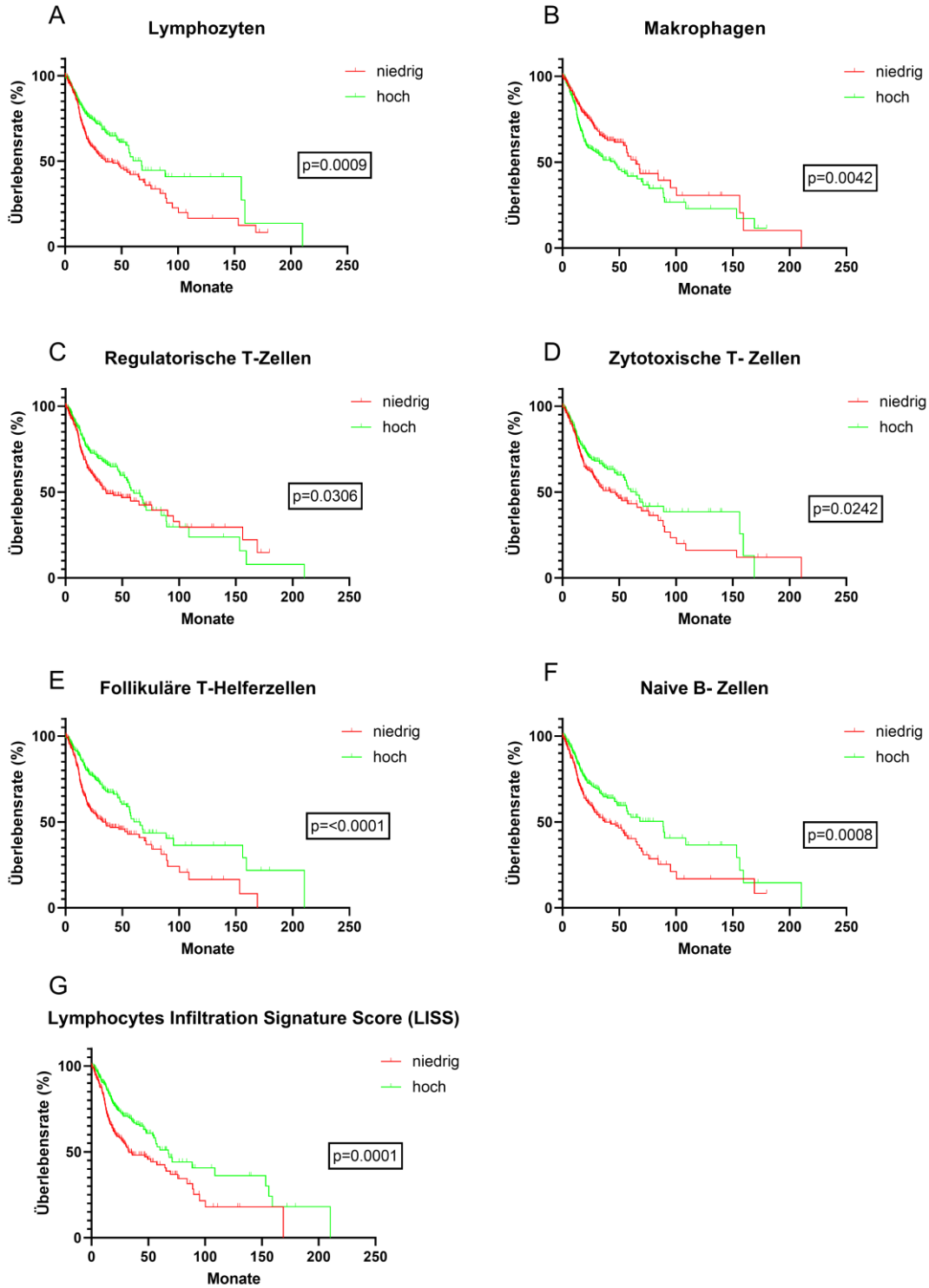
4.1.1 Histopathologische Charakteristika des UKS-Kollektivs

**Tabelle 10: Patientenkollektiv des UKS gesamt**

		HNSCC Patienten
<b>Patientenzahl</b>		101
<b>Geschlecht</b>	männlich	84 (83%)
	weiblich	17 (17%)
<b>Medianes Alter</b>		63,35
<b>HPV- Status</b>	positiv	18 (18%)
	negativ	83 (82%)
<b>Tumorlokalisation</b>	Oropharynx	42 (41%)
	Larynx	28 (28%)
	Hypopharynx	12 (12%)
	Mundhöhle	19 (19%)
<b>UICC Stadium (8. TNM Version)</b>	I	21 (21%)
	II	18 (18%)
	III	17 (17%)
	IVa	33 (33%)
	IVb	6 (6%)
	IVc	5 (5%)
<b>Therapie</b>	Alleinige Operation	29 (28%)
	Operation + adj. RT	22 (22%)
	Operation+ adj. RCT	23 (23%)
	primäre RCT	17 (17%)
	primäre RT	1 (1%)
	primäre RT + Cetuximab	3 (3%)
	Operation+ adjuvante RT + Cetuximab	1 (1%)
	Palliative Systemtherapie	4 (4%)

## 4.2 Untersuchungen der TCGA-HNSC-Kohorte

### 4.2.1 Prognostische Relevanz der Immunzellinfiltration und -aktivität innerhalb der TCGA-HNSC-Kohorte



**Abbildung 5: Prognostische Aussagekraft der Immunzellinfiltration innerhalb der TCGA-Kohorte.** Gesamtüberleben der Patienten der TCGA-Kohorte (hoch vs. niedrig) in Abhängigkeit der Immunzellinfiltration der (A) Lymphozyten, (B)

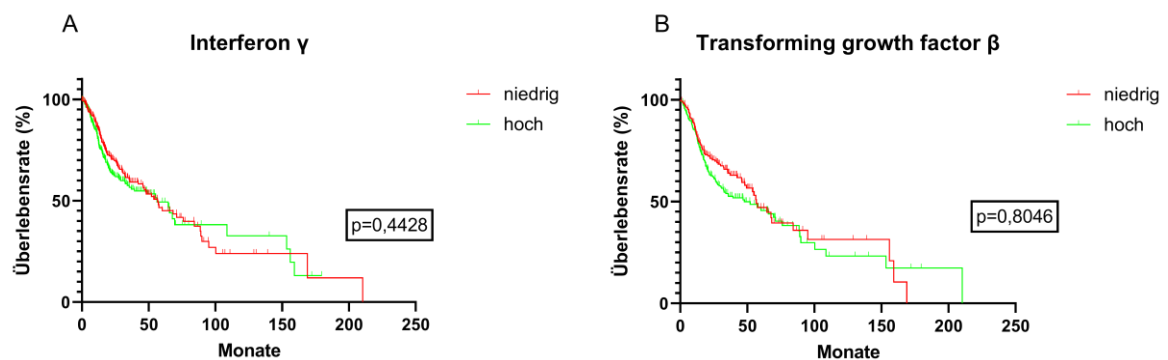
Makrophagen, (C) Regulatorischen T-Zellen, (D) Zytotoxischen T- Zellen, (E) Follikulären T- Helferzellen, (F) Naiven B-Zellen und dem (G) Lymphocytes Infiltration Signature Score (LISS). Das Gesamtüberleben wurde mithilfe eines log-rank Tests analysiert. Die P-Werte sind neben den jeweiligen Graphen angegeben. Vertikale Linien auf den Kaplan-Meier-Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

Im ersten Teilabschnitt dieser Arbeit wurde die prognostische Relevanz diverser Immunparameter der TCGA-HNSC-Kohorte (n=513) evaluiert, wozu basierend auf einer Immundekonvolution der RNAseq Daten dieses Kollektivs insgesamt 29 Immunzellsubpopulationen, immunologisch bedeutsame Zytokine sowie immunologische Checkpoint-Rezeptoren und -Liganden analysiert und mit dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert wurden (nähere Informationen zur Methodik der Immundekonvolution s. Material und Methoden Kapitel 3.3): CD8+ T -Zellen, CD4+ aktivierte T-Gedächtniszellen, CD4+ ruhende T-Gedächtniszellen, CD4+ naive T-Zellen, follikuläre T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen, Gesamt-Lymphozyten (entweder definiert durch den Lymphozyten-Infiltrations-Signatur-Score (LISS; (THORSSON et al., 2018)) oder definiert als Immun-Subpopulation auf der Grundlage von Genexpressions-Signatur-Scores gemäß (THORSSON et al., 2018)), die Gesamt-Leukozytenpopulation, B-Zell Gedächtniszellen, naive B-Zellen, eosinophile Granulozyten, IFN-gamma, TGF-beta, TH1 Zellen, TH2 Zellen, TH17 Zellen, M1 Makrophagen, M2 Makrophagen, M0 Makrophagen, Makrophagen als Gesamtpopulation, Mastzellen, Monozyten, neutrophile Granulozyten, Plasmazellen, aktivierte NK-Zellen, ruhende NK-Zellen, dendritische Zellen als Gesamtpopulation, aktivierte dendritische Zellen und ruhende dendritische Zellen. Für die statistische Analyse erfolgte eine Einteilung des TCGA-HNSC Kollektivs für die einzelnen Immunparameter anhand des Medians in die Kategorien „niedrig“ mit jeweils n=256 Patienten und in die Kategorie „hoch“ mit jeweils n=257 Patienten, sowie einem anschließenden Vergleich der Gesamt-Überlebenskurven dieser beider Kategorien durch die Kaplan-Meier-Methode.

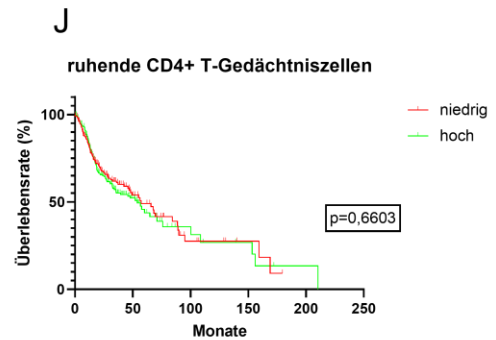
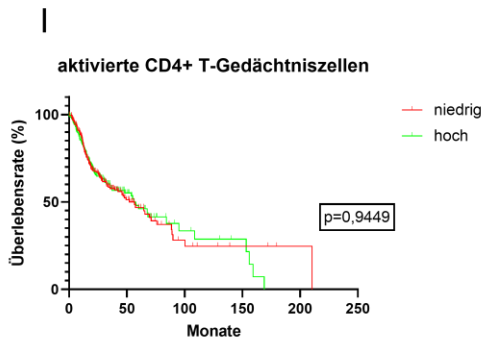
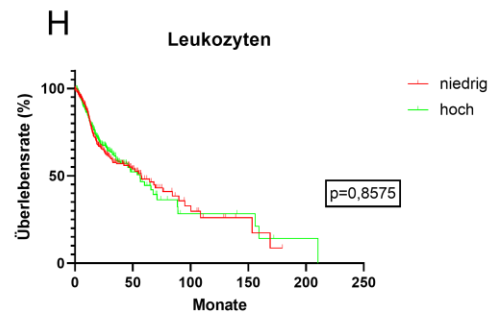
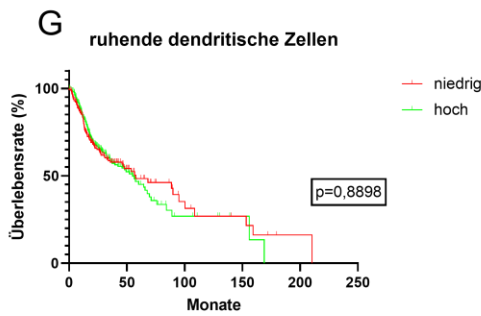
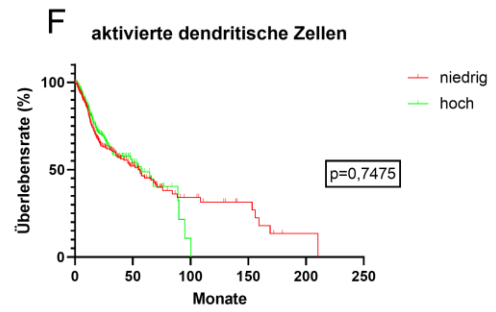
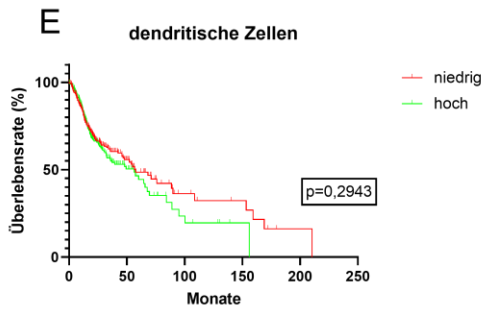
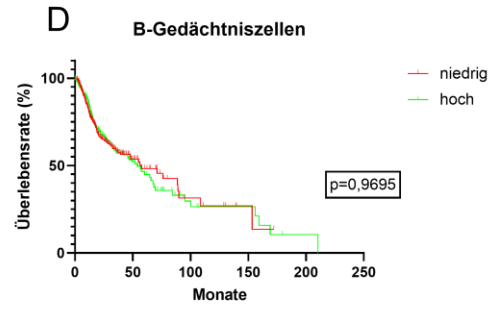
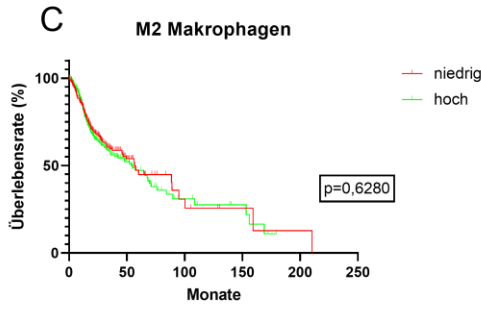
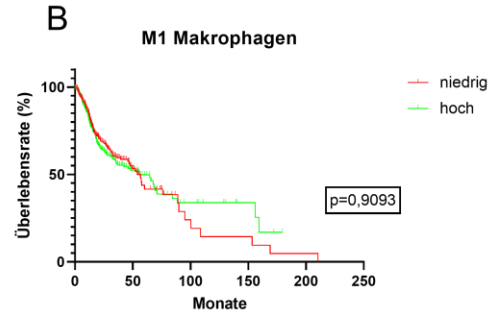
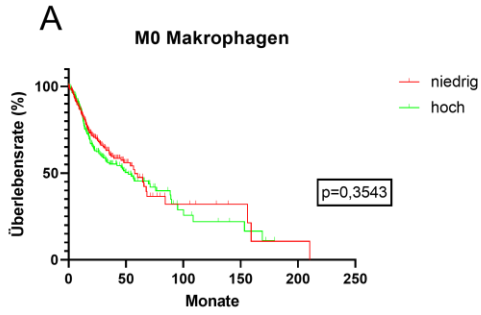
Bei sieben der 29 analysierten Immunparameter zeigte sich eine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Patienten, was auf eine prognostische Relevanz innerhalb der TCGA-HNSC-Kohorte hindeutet. Ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben zeigte sich bei Patienten der TCGA-HNSC-Kohorte mit erhöhten follikulären T-Helferzellen ( $p < 0.001$ ), LISS (Lymphocytes infiltration signature score) ( $p = 0.001$ ), naiven B-Zellen ( $p = 0.008$ ), zytotoxischen T-Zellen ( $p = 0.0242$ ), Lymphozyten ( $p = 0.009$ ), und regulatorischen T-Zellen ( $p = 0.0306$ , s. Abbildung 5). Umgekehrt korrelierte eine hohe Infiltration des Tumorgewebes mit Makrophagen mit einer schlechteren Prognose ( $p = 0,0042$ ). Die Überlebensanalysen mit nicht-signifikantem Ergebnis in der statistischen Testung sind in den Abbildungen sechs und sieben dargestellt. Um den prognostischen Effekt des HPV-Tumorstatus als potenzielle Verzerrung in der Überlebensanalyse zu berücksichtigen, erfolgte zusätzlich eine Multivarianzanalyse mit logistischer Regression, die den HPV-Tumorstatus in den oben erwähnten, sieben Immunparametern mit statistisch signifikanter Relevanz für das Patientenüberleben kontrollierte. Dabei behielten alle Immunparameter mit Ausnahme der naiven B-Zellen ihre statistische Bedeutung als prognostische Biomarker bei (siehe Tabelle 11).

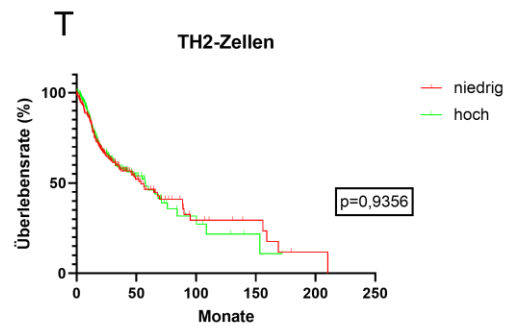
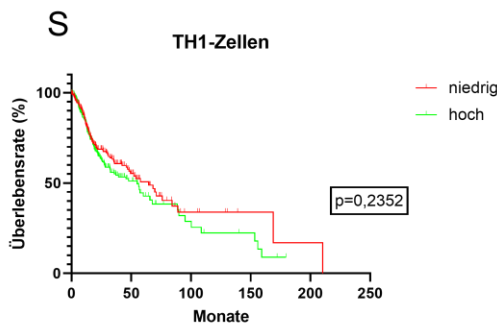
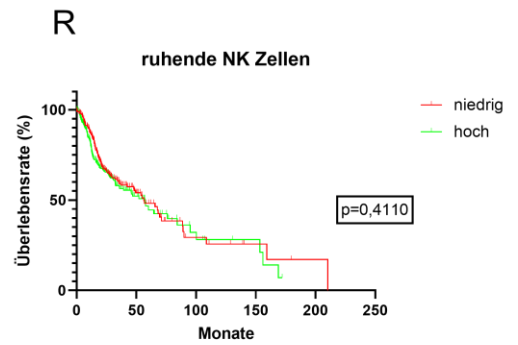
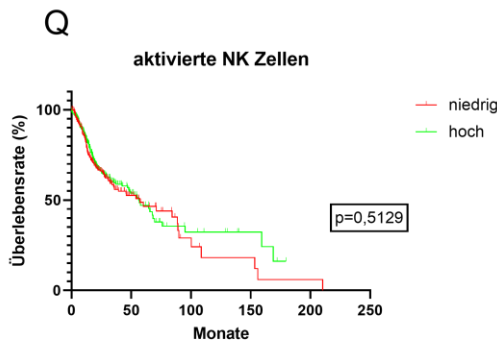
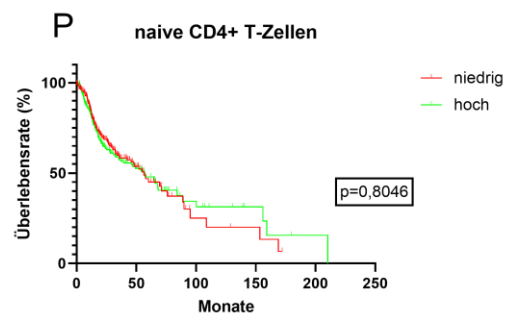
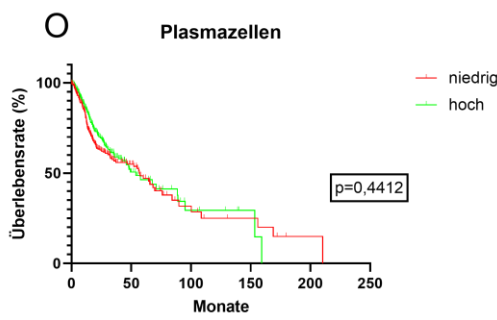
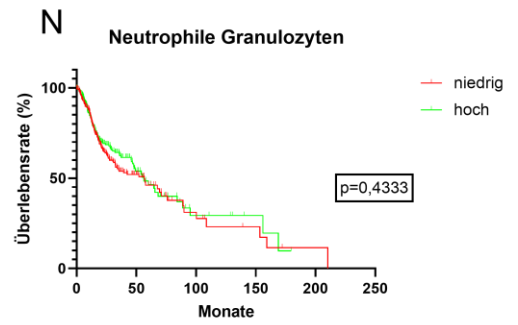
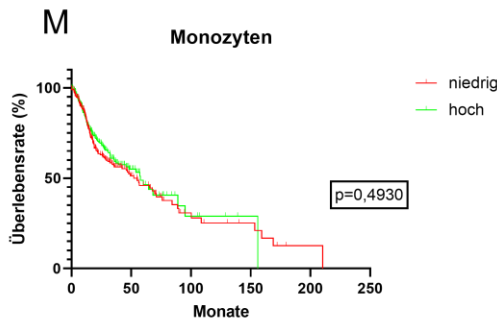
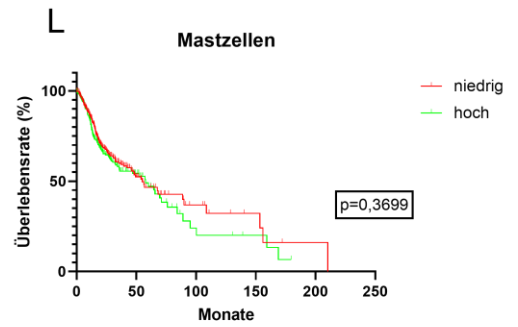
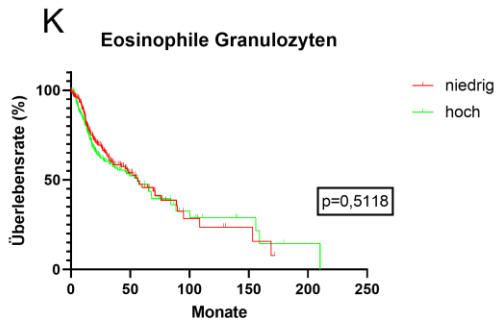
**Tabelle 11: Multivarianzanalyse der TCGA-HNSC Kohorte**

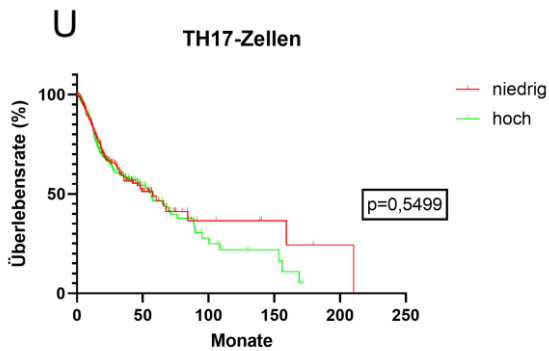
Immunezellsubpopulationen	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall
Lymphozyten	0,1103	0,02991 bis 0,3959
Naive B-Zellen	0,02991	0,0003471 bis 2,125
Lymphocyte Infiltration Signature Score	0,7748	0,6445 bis 0,9285
Makrophagen	10,17	2,731 bis 38,97
Follikuläre T-Helferzellen	0,006322	0,0001018 bis 0,3537
Regulatorische T-Zellen	0,00003429	2,529e-008 bis 0,03149
Zytotoxische T-Zellen	0,091	0,007974 bis 0,9682



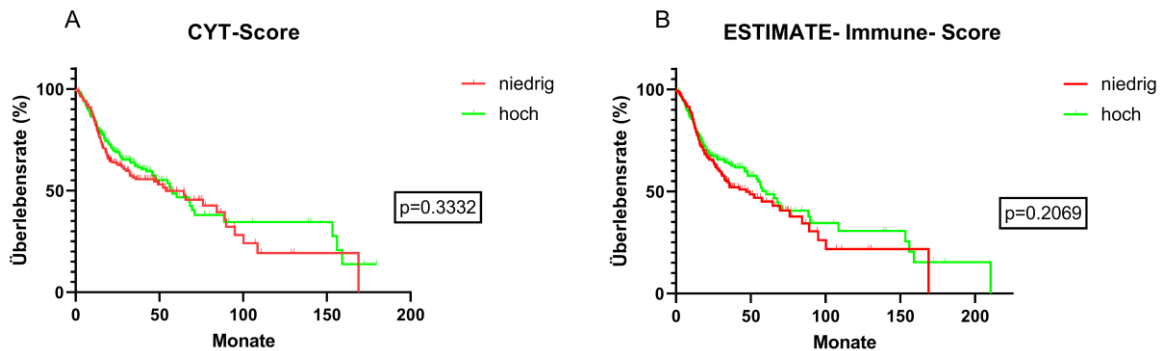
**Abbildung 6: Prognostische Aussagekraft der Zytokine innerhalb der TCGA-Kohorte.** Gesamtüberleben der Patienten der TCGA-Kohorte (hoch vs. niedrig) in Abhängigkeit der Immunezellinfiltration von (A) Interferon gamma, und (B) Transforming growth factor beta. Das Gesamtüberleben wurde mithilfe eines log-rank Tests analysiert. Die p-Werte sind neben den jeweiligen Graphen angegeben. Vertikale Linien auf den Kaplan-Meier-Kurven kennzeichnen zensierte Daten.







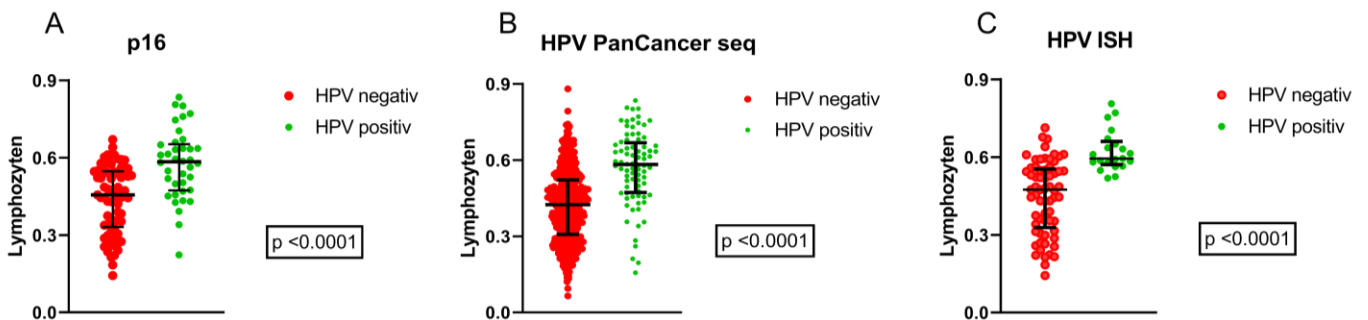
**Abbildung 7: Prognostische Aussagekraft der Immunzellinfiltration innerhalb der TCGA-Kohorte.** Gesamtüberleben der Patienten der TCGA-Kohorte (hoch vs. niedrig) in Abhängigkeit der Immunzellinfiltration der (A) M0 Makrophagen, (B) M1 Makrophagen, (C) M2 Makrophagen, (D) B-Gedächtniszellen, (E) dendritischen Zellen, (F) aktivierten dendritischen Zellen, (G) ruhenden dendritischen Zellen, (H) Leukozyten, (I) aktivierten CD4+ T-Gedächtniszellen, (J) ruhenden CD4+ T-Gedächtniszellen, (K) Eosinophile Granulozyten, (L) Mastzellen, (M) Monozyten, (N) Neutrophilen Granulozyten, (O) Plasmazellen, (P) naiven CD4+ T-Zellen, (Q) aktivierten NK-Zellen, (R) ruhenden NK-Zellen, (S) TH1-Zellen, (T) TH2-Zellen, und (U) TH 17-Zellen. Das Gesamtüberleben wurde mithilfe eines log-rank Tests analysiert. Die p-Werte sind neben den jeweiligen Graphen angegeben. Vertikale Linien auf den Kaplan-Meier-Kurven kennzeichnen zensierte Daten.



**Abbildung 8: Prognostische Aussagekraft der zytolytischen Aktivität der Immunzellen und der Gesamt-Immunzellinfiltration innerhalb der TCGA-HNSC-Kohorte.** Gesamtüberleben der Patienten der TCGA-HNSC-Kohorte in Abhängigkeit der Gesamt-Immunzellaktivität und -infiltration (hoch vs. niedrig), gemessen durch den (A) CYT-Score und den (B) ESTIMATE-Immune-Score. Die Vergleiche des Gesamtüberlebens wurden mithilfe eines log-rank Tests statistisch analysiert. Die p-Werte sind neben den jeweiligen Graphen angegeben. Vertikale Linien auf den Kaplan-Meier-Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

Als Indikatoren der Gesamt-Immunzellaktivität und -infiltration wurden der CYT-Score (n= 482, p=0.3332) und der ESTIMATE-Immune-Score (n=511, p=0.2069) analysiert. Beide Scores zeigten in der statistischen Analyse keine signifikanten Auswirkungen auf das Gesamtüberleben (s. Abbildung 8).

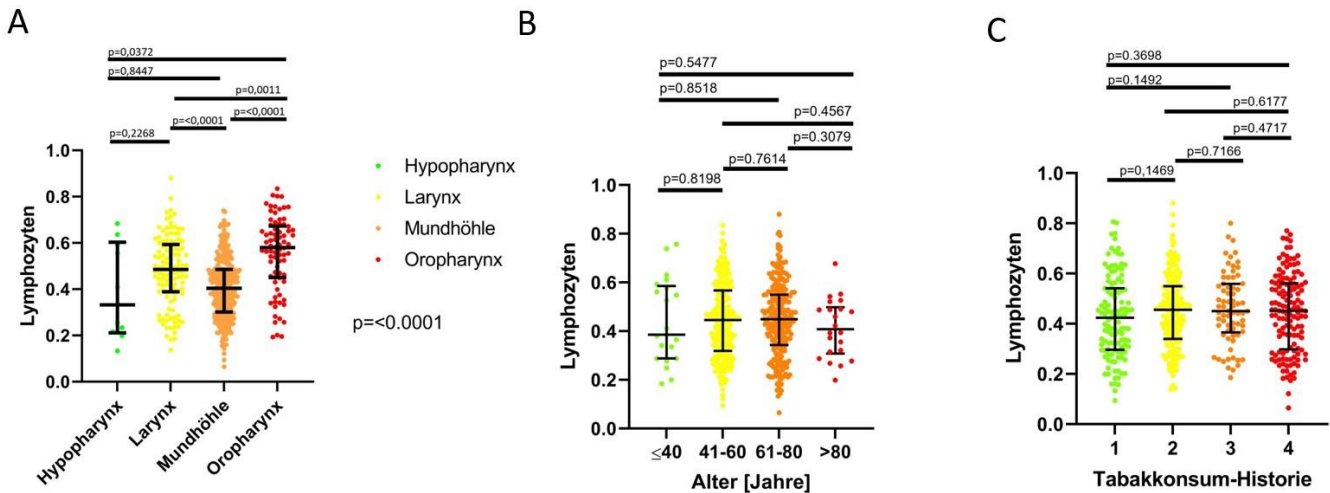
#### 4.2.2 Klinische und histopathologische Charakteristika der TCGA-HNSC-Kohorte und Korrelation mit der Immuninfiltration



**Abbildung 9: Korrelation der lymphozytären Immunzellinfiltration mit dem HPV-Tumorstatus der TCGA-HNSC-Kohorte.** Korrelation der lymphatischen Immunzellinfiltration mit dem HPV-Tumorstatus, bestimmt durch (A) p16-Immunhistochemie (n=111), (B) PanCancer seq Daten (n=513), und (C) HPV-DNA in situ Hybridisierung (n=86). In (A) bis (C) wird der Median durch die horizontale Linie und der Interquartils-Abstand durch die Fehlerbalken angezeigt. Statistik: Mann-Whitney Test. Die p-Werte sind neben den jeweiligen Abbildungen angegeben. ISH – in situ Hybridisierung.

Für die Analyse der Korrelation klinischer und histopathologischer Charakteristika der Patienten der TCGA-HNSC-Kohorte mit der Immunzellinfiltration wurde die lymphatische Immunzellinfiltration des Tumormikromilieus, gemessen anhand von Genexpression-Signature Scores nach *Thorsson et al.* (THORSSON et al., 2018), verwendet. Der HPV-Tumorstatus wurde hierbei durch drei verschiedene Methoden bestimmt: p16 Immunhistochemie (Daten verfügbar für n=111 Patienten, 73 negativ, 38 positiv), HPV-DNA in situ Hybridisierung (ISH; Daten verfügbar für n= 86; 65 negativ, 21 positiv), und durch PanCancer seq Daten (Daten verfügbar für alle Patienten, n=513, 433 negativ, 80 positiv) (CAMPBELL et al., 2018). Wie in Abbildung 9 dargestellt, zeigte der HPV-Status unabhängig von der genutzten Methodik eine starke positive Korrelation mit der lymphatischen Immunzellinfiltration.

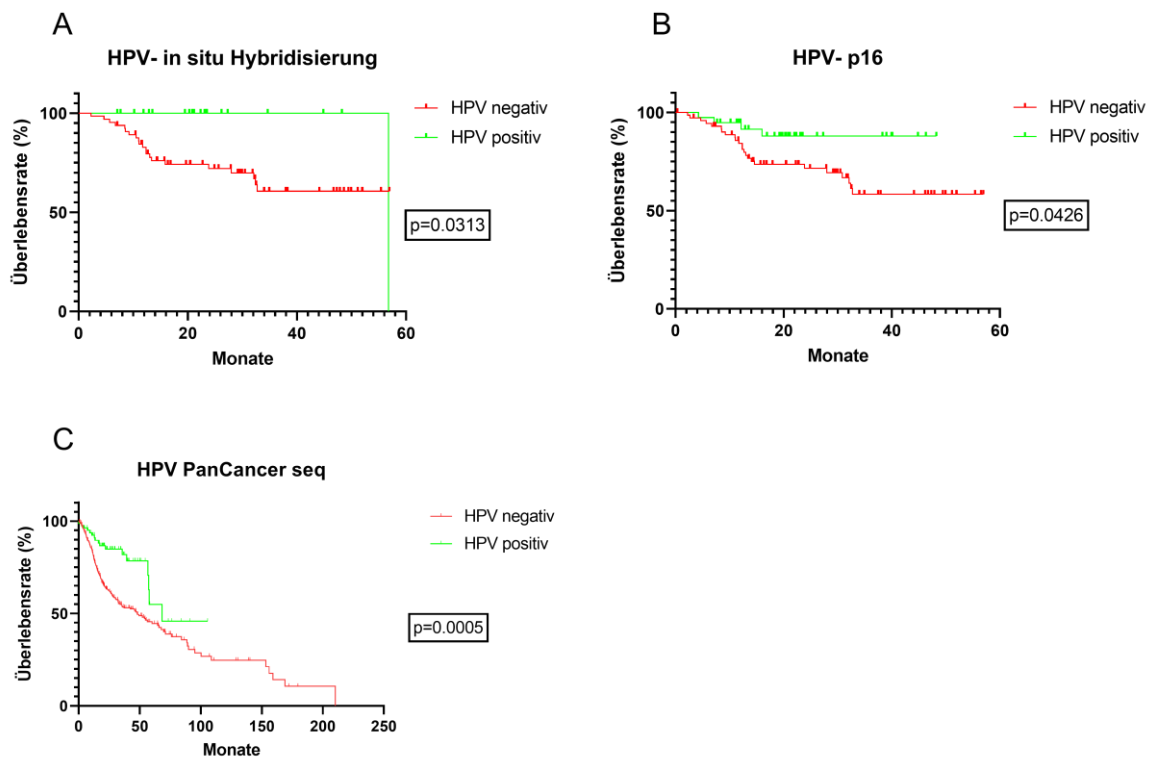




**Abbildung 10: Korrelation der lymphozytären Immunzellinfiltration mit klinischen Charakteristika der TCGA-HNSC-Kohorte.** Korrelation der lymphatischen Immunzellinfiltration mit (A) Tumorlokalisation, (B) Patientenalter, (C) Raucherhistorie, mit Einteilung der Patienten anhand ihrer Rauchgewohnheiten in 4 Kategorien: (1) Patienten die noch nie geraucht haben, (2) Raucher (3) Nichtraucher seit  $\geq 15$  Jahren, (4) Nichtraucher seit  $< 15$  Jahren. In (A) bis (C) wird der Median durch die horizontale Linie und der Interquartils-Abstand durch die Fehlerbalken angezeigt. Statistik: unpaired t-test, Mann-Whitney-Test, Kruskal Wallis-Test, Welch's-Test. Die p-Werte sind in der Abbildung angegeben.

Im Rahmen der Analyse weiterer klinischer Patientencharakteristika der TCGA-HNSC Kohorte zeigte sich ein signifikanter Einfluss der primären Tumorlokalisation auf die lymphozytäre Immunzellinfiltration ( $p < 0,0001$ , Abbildung 10A). Die höchste Immunzellinfiltration konnte im Falle der Oropharynxkarzinome ( $n=78$ ), gefolgt von Larynxkarzinomen ( $n=116$ ), Hypopharynxkarzinomen ( $n=10$ ), und Karzinomen der Mundhöhle ( $n=309$ ) verzeichnet werden. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das Alter oder die Raucherhistorie der Patienten auszuschließen, erfolgte eine Korrelation dieser Patientenmerkmale mit der lymphatischen Immunzellinfiltration. Die Raucherhistorie wurde durch die Rauchgewohnheiten der Patienten definiert und in 4 Kategorien eingeteilt: (1) Patienten, die noch nie geraucht haben, (2) aktive Raucher (3) Nichtraucher seit  $\geq 15$  Jahren, (4) Nichtraucher seit  $< 15$  Jahren. Dabei zeigten in der statistischen Auswertung weder das Patientenalter noch die Raucherhistorie einen signifikanten Effekt auf die lymphatische Immunzellinfiltration (s. Abbildung 10 B+C).

#### 4.2.3 Prognostische Relevanz des HPV-Tumorstatus in der TCGA-HNSC-Kohorte



**Abbildung 11: Prognostische Aussagekraft des HPV-Tumorstatus innerhalb TCGA-HNSC-Kohorte.** Gesamtüberleben der TCGA-HNSC-Kohorte in Bezug auf die unterschiedlich angewandte Methodik zur Bestimmung des HPV-Tumorstatus mit (A) HPV-DNA in situ Hybridisierung (n=86), (B) p16-Immunhistochemie (n=111) und PanCancer seq Daten (n=513). Das Gesamtüberleben wurde mithilfe eines log-rank Tests analysiert. Die p-Werte sind neben den jeweiligen Graphen angegeben. Vertikale Linien auf den Kaplan-Meier-Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

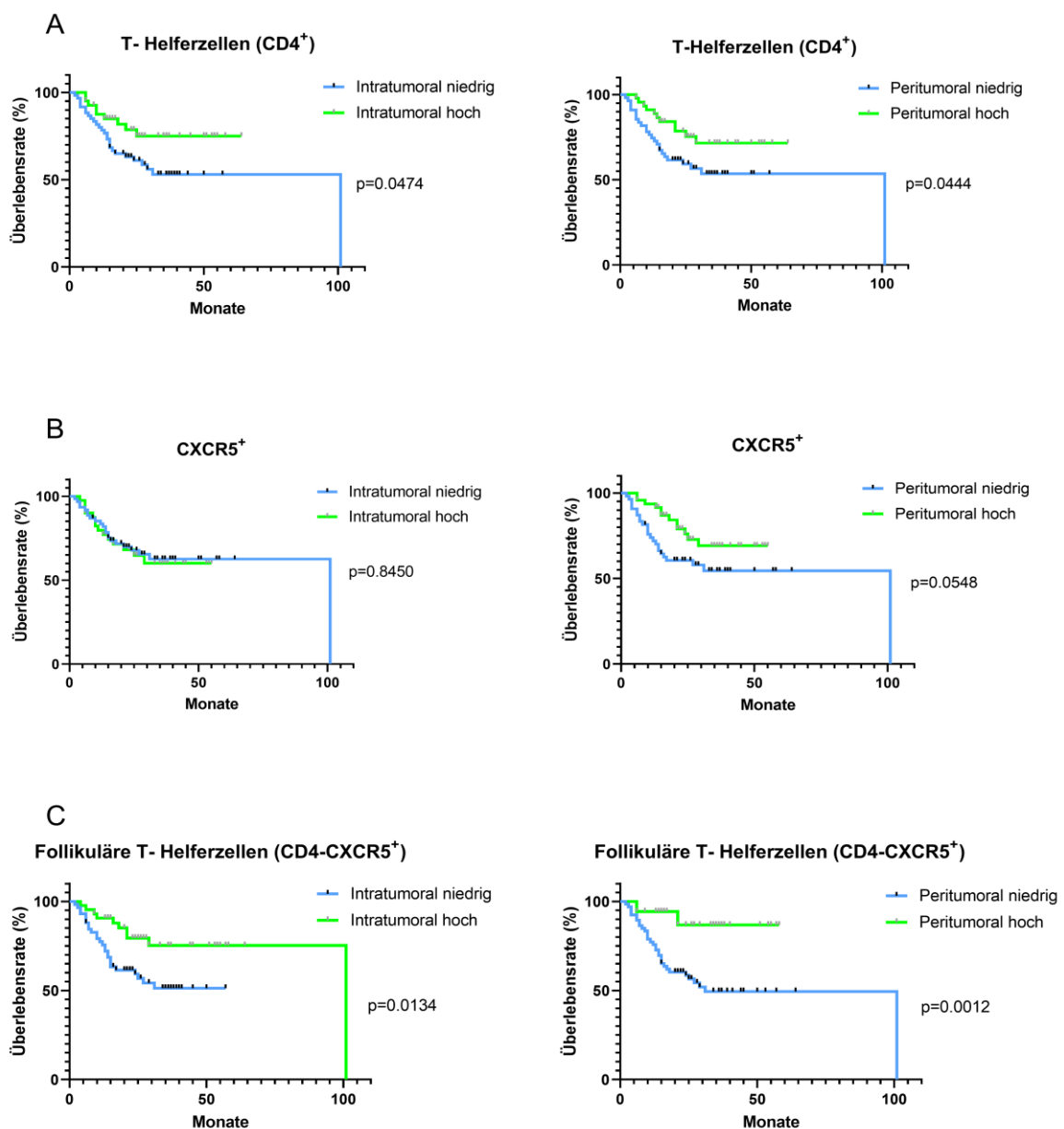
Die Ermittlung der prognostischen Relevanz des HPV-Tumorstatus in der TCGA-HNSC-Kohorte basierte wie zuvor ausgeführt auf den unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung des HPV-Status. Hierbei erfolgte die Bestimmung des HPV-Status durch: p16 Immunhistochemie (n=111, 73 negativ, 38 positiv), HPV-DNA in situ Hybridisierung (ISH; n= 86; 65 negativ, 21 positiv), und durch die Nutzung von PanCancer seq Daten (n=513, 433 negativ, 80 positiv) (CAMPBELL et al., 2018). Unabhängig der genutzten Methodik zeigte sich hierbei eine starke positive Korrelation des Gesamtüberlebens mit einem positiven HPV-Status. Die größte Signifikanz zeigte hierbei der positive HPV-Status im Rahmen der HPV PanCancer seq Bestimmung ( $p=0,0005$ ; Abbildung 11C), wobei hier auch die Zahl der Patienten mit verfügbaren Daten mit Abstand am größten war.

#### 4.3 Immunhistochemische Analysen des Patientenkollektivs des UKS (Validierungs-Kohorte)

Im zweiten Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden zur Validierung der auf RNAseq Daten basierenden Ergebnisse der TCGA-HNSC-Kohorte immunhistochemische Analysen an einer zweite Kohorte mit n=101 HNSCC-Patienten (syn.Validierungskohorte), die alle in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde an der Universität des Saarlandes behandelt wurden, verwendet. Im

Rahmen der Validierung der TCGA-Daten erfolgte eine immunhistochemische Analyse und Korrelation mit dem Gesamtüberleben der sieben Immunparameter, die die höchste Signifikanz hinsichtlich einer prognostischen Aussagekraft innerhalb der TCGA-HNSC-Kohorte aufwiesen. Ziel war es dabei zu evaluieren, ob die Immunparameter, die in der TCGA-HNSC-Kohorte durch eine RNA-Sequenzierung bestimmt wurden und bei diesen Patienten prognostisch relevant waren, auch in einer davon unabhängigen Kohorte und bei methodisch anderer Detektion ihre prognostische Signifikanz behalten, was deren Validität als prognostische Marker bei HNSCC-Patienten deutlich erhöhen würde. Epidemiologische sowie klinische Daten der Validierungskohorte sind in Tabelle 10 in Kapitel 4.1.1 bereits dargestellt worden.

#### 4.3.1 Prognostische Relevanz der Immunzellinfiltration und -aktivität innerhalb der UKS-Kohorte



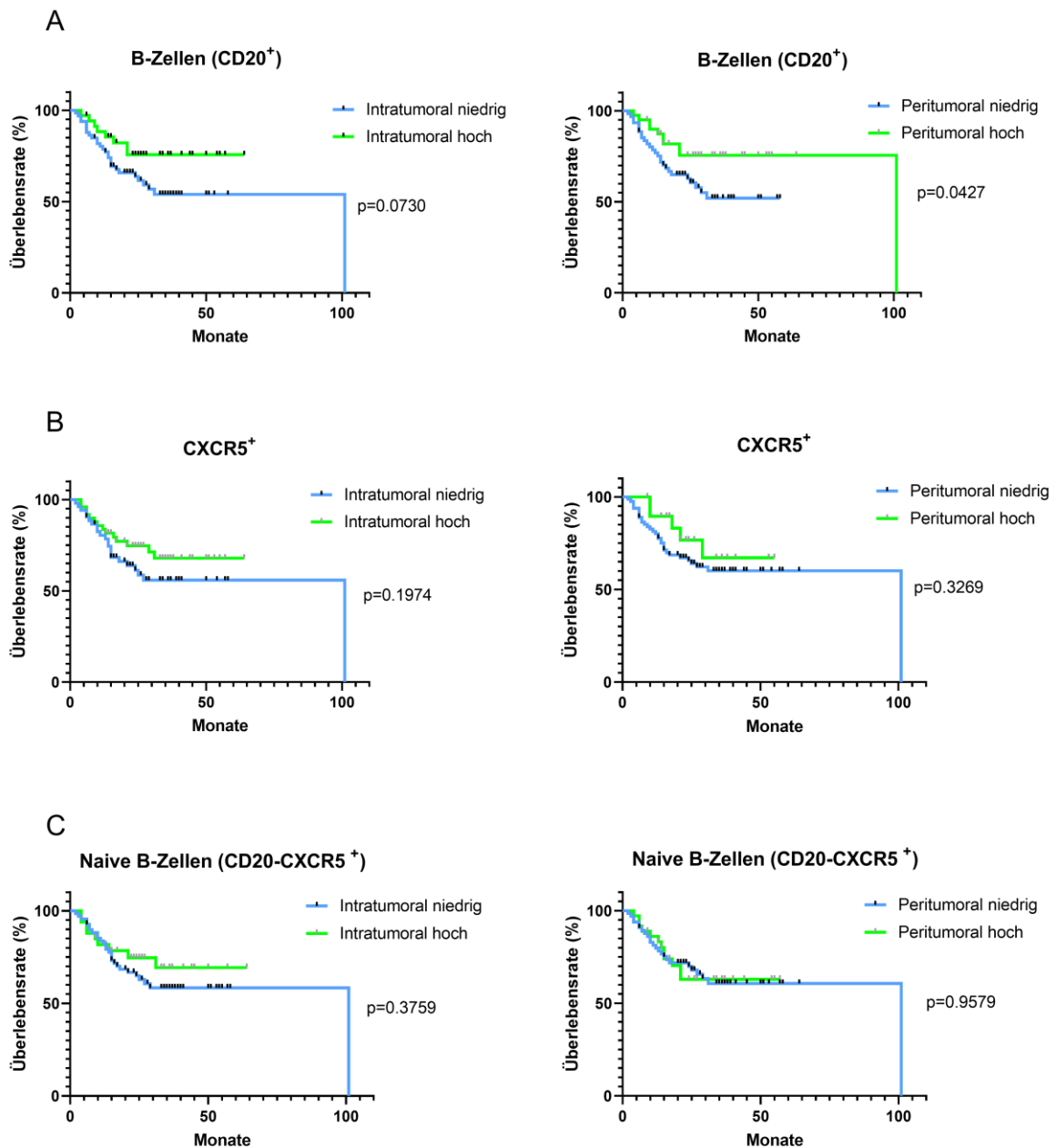
**Abbildung 12: Prognostische Aussagekraft der Immunzellinfiltration der CD4-CXCR5<sup>+</sup> Färbung innerhalb der UKS-Kohorte.** Nach immunhistochemischer Analyse des intra- und peritumoralen Kompartiments erfolgte für alle Teilfärbungen

der CD4-CXCR5 Färbung eine Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Patienten, wobei die Patienten anhand des Mittelwerts der jeweiligen mIRS-Scores in eine „hoch“ und „niedrig“-Gruppe kategorisiert wurden. Gezeigt sind die Kaplan-Meier-Analysen für die Immunzellinfiltration der (A) CD4+ T-Helferzellen, (B) der CXCR5+ Zellen im Rahmen der CD4-CXCR5 Färbung und (C) der follikulären T-Helferzellen. Vertikale Linien auf den Kaplan-Meier-Kurven kennzeichnen zensierte Daten. Statistik: log-rank-Test; die P-Werte sind neben den Kaplan-Meier-Kurven angegeben.

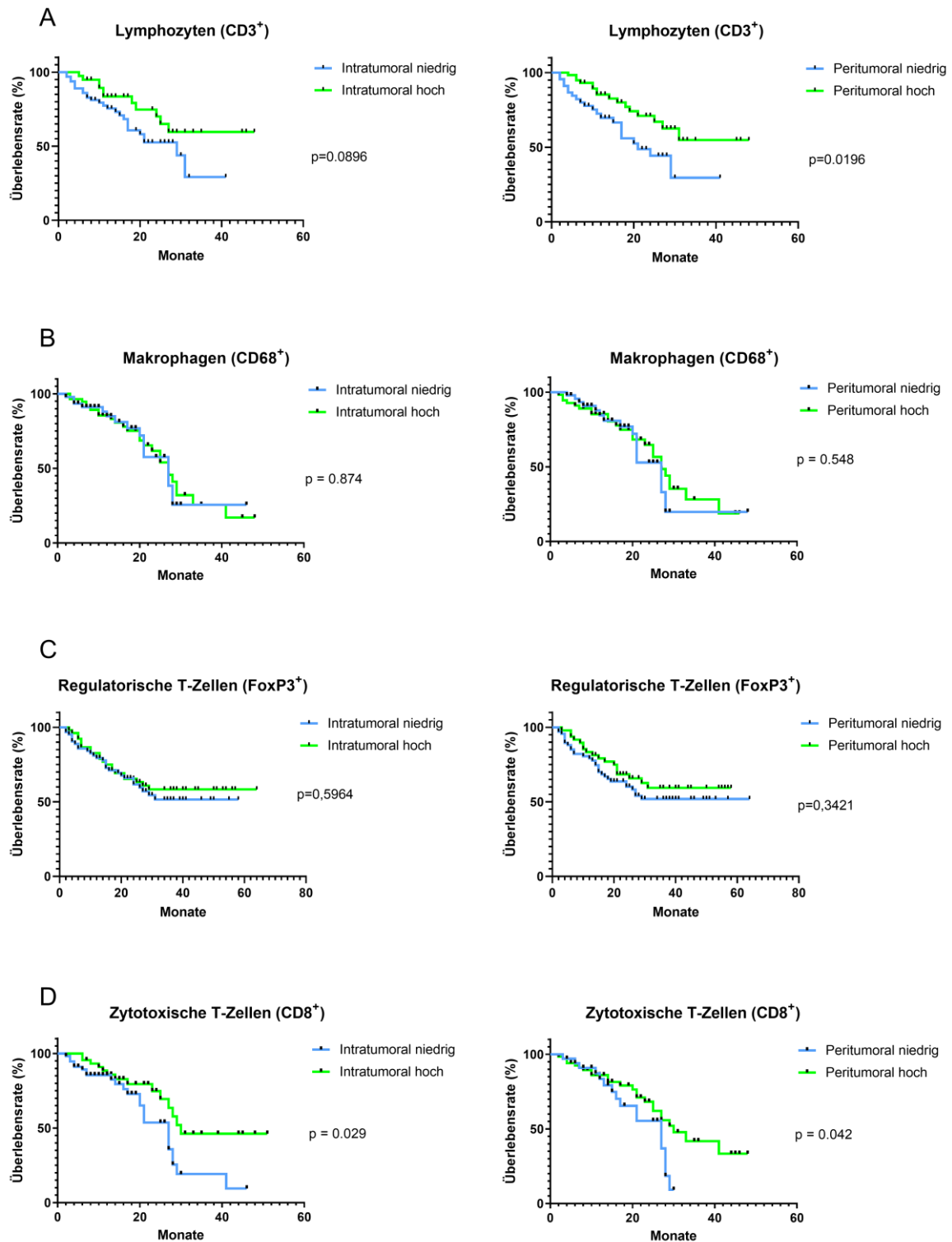
Nach Einteilung des UKS-Kollektivs in eine „hoch“ und „niedrig“ Kategorie anhand des Mittelwerts des mIRS für die jeweilige Immunzellpopulation erfolgte eine Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Patienten. Als immunhistochemische Marker wurden hierbei für die follikulären T-Helferzellen die Kombination von CD4 und CXCR5, für die Lymphozyten als Gesamtpopulation CD3, für die naiven B-Zellen die Kombination von CD20 und CXCR5, für zytotoxische B-Zellen CD8 und für regulatorische T-Zellen FOXP3 verwendet. Das intratumorale wie auch das peritumorale Kompartiment wurden im Rahmen der statistischen Analyse gesondert betrachtet. Die Analyse der Doppelfärbung beinhaltete die separate Begutachtung der einzelnen Teilfärbungen sowie die Begutachtung und Auszählung der doppelt-gefärbten Zellen, was zu jeweils drei verschiedenen Gesamtüberlebenskurven führte. Analog zur TCGA-HNSC-Kohorte erfolgte, zur Vermeidung einer HPV-induzierten Verzerrung in der Überlebensanalyse, eine logistische Regressionsanalyse zur Kontrolle für den HPV-Tumorstatus als Kovariate. Im Rahmen der CD4-CXCR5 Doppelfärbung zeigte sich eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens im Falle einer erhöhten intratumoralen ( $p=0,0474$ ) und peritumoralen ( $p=0,0444$ ) Infiltration mit CD4+ T-Helferzellen (Abbildung 12A). Die CXCR5-Teilfärbung zeigte sowohl intra- wie auch peritumoral keine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben. Peritumoral zeigte sich jedoch eine Tendenz hin zu einem verbesserten Überleben bei erhöhter Infiltration mit CXCR5-single positiven Immunzellen (vgl. Abbildung 12B). Bei Analyse der CD4-CXCR5-doppelt positiven Immunzellen bestätigte sich der positive prognostische Effekt der follikulären T-Helferzellen innerhalb der TCGA-HNSC-Kohorte für das UKS-Validierungs-Kollektiv, sowohl intra- ( $p=0,0134$ ) wie auch peritumoral ( $p=0,0012$ ;(Abbildung 12C).

Die Analyse der CD20-CXCR5 Färbung erfolgte analog zur CD4-CXCR5 Färbung. Hierbei wurde das intratumorale und peritumorale Kompartiment erneut gesondert betrachtet, jede Teilfärbung sowie das Produkt der beiden Einzelfärbungen isoliert analysiert und mit dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert (siehe Abbildung 13). In der Kaplan-Meier Kurve der CD20+-B-Zellen zeigte sich peritumoral bei hoher Infiltration eine signifikante Verbesserung der Prognose ( $p=0,0427$ ). Intratumoral konnte eine klinische Tendenz hin zu einer Prognoseverbesserung im Falle einer erhöhten Immunzellinfiltration des Tumors festgestellt werden bei jedoch sehr deutlicher Tendenz in diese Richtung ( $p=0,0730$ ). Die CXCR5-Teilfärbung zeigte sowohl intra- wie auch peritumoral keine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens im Falle einer erhöhten Infiltration des Tumormikromilieus. Entgegen dem prognoseverbessernden Effekt der naiven B-Zellen innerhalb der TCGA-HNSC-Kohorte, zeigte sich in der Validierungskohorte lediglich intratumoral eine Tendenz für ein verbessertes Gesamtüberleben ( $p=0,3759$ ) bei gesteigerter Immunzellinfiltration. Peritumoral konnte kein statistisch signifikanter

Zusammenhang zwischen Infiltration des TME mit naiven B-Zellen und dem Gesamtüberleben der Patienten gefunden werden ( $p=0,9579$ ).

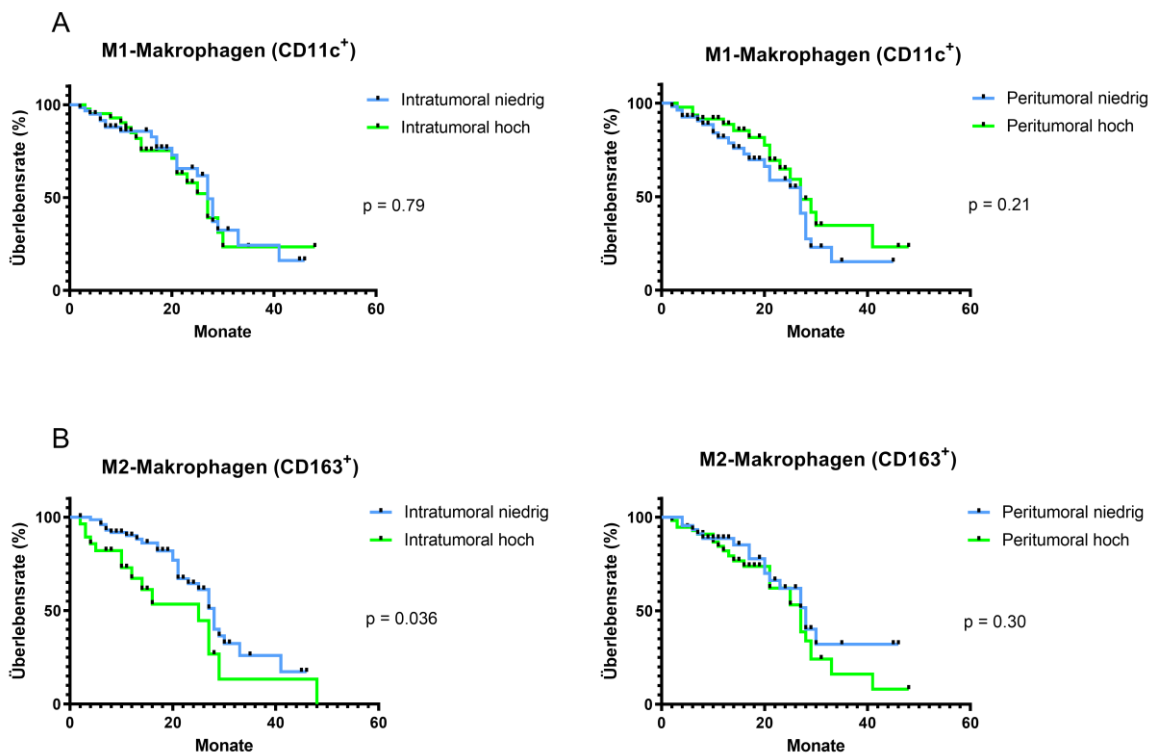


**Abbildung 13: Prognostische Aussagekraft der Immuneinfiltration der CD20-CXCR5<sup>+</sup> Färbung innerhalb der UKS-Kohorte.** Nach immunohistochemischer Analyse des intra- und peritumoralen Kompartiments erfolgte für alle Teilfärbungen der CD20-CXCR5 Färbung eine Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Patienten. Dargestellt sind die Analysen für die Immuneinfiltration der (A) CD20<sup>+</sup> B-Zellen, (B) der CXCR5<sup>+</sup> Zellen im Rahmen der CD20-CXCR5 Färbung und (C) der naiven B-Zellen. Statistik: log-rank-Test; die P-Werte sind neben den Kaplan-Meier-Kurven angegeben. Die vertikalen Linien auf den Kaplan-Meier-Kurven kennzeichnen zensierte Daten.



**Abbildung 14: Prognostische Aussagekraft der Immuzellinfiltration innerhalb der UKS-Kohorte.** Nach immunhistochemischer Analyse des intra- und peritumoralen Kompartiments erfolgte für alle Teilfärbungen der Färbungen ehemaliger Doktoranden der Arbeitsgruppe eine Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Patienten. Dargestellt sind die Analysen der Immuzellinfiltration der (A) Lymphozyten (CD3+), (B) Makrophagen (CD68+) (C) regulatorischen T-Zellen (FoxP3+) und (D) zytotoxischen T-Zellen (CD8+). Statistik: log-rank-Test; die p-Werte sind neben den Kaplan-Meier-Kurven angegeben. Die vertikalen Linien auf den Kaplan-Meier-Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

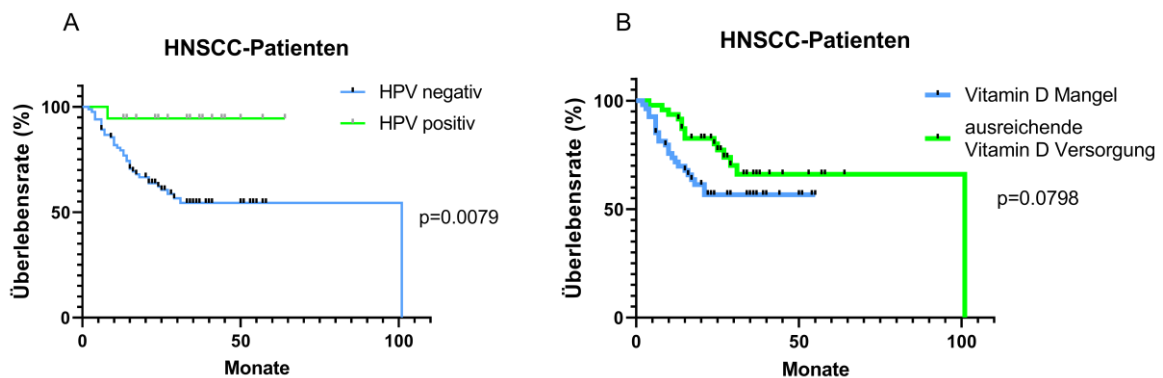
Durch die Vorarbeit diverser Doktoranden der AG Linxweiler und der freundlichen Überlassung Ihrer Daten konnte die Validierung der TCGA- HNSC-Analysen noch um die Betrachtung der Lymphozyten als Gesamtpopulation, detektiert durch eine gegen CD3 gerichtete immunhistochemische Färbung, der Makrophagen, detektiert durch eine gegen CD68 gerichtete immunhistochemische Färbung, der regulatorischen T-Zellen, detektiert durch eine gegen FOXP3 gerichtete immunhistochemische Färbung, und der zytotoxischen T-Zellen, detektiert durch eine gegen CD8 gerichtete immunhistochemische Färbung, ergänzt werden. Die Kaplan Meier Kurven dieser Immunzellen sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Lymphozyten zeigten hierbei bei peritumoral hoher Infiltration eine signifikante Verbesserung der Prognose der Patienten ( $p=0,0196$ ). Intratumoral zeigte sich eine Tendenz hin zu einer Prognoseverbesserung im Falle einer verstärkten lymphozytären Infiltration des Tumors ( $p=0,0896$ ). Sowohl die CD68+-Makrophagen als auch die FoxP3+-regulatorischen T-Zellen konnten weder intra- noch peritumoral das prognoseverbessernde Ergebnis der TCGA-HNSC-Kohorte in der UKS-Validierungskohorte bestätigen. Dagegen zeigten die zytotoxischen T-Zellen sowohl intra- ( $p=0,029$ ) wie auch peritumoral ( $p=0,042$ ), passend zu den Ergebnissen der TCGA-HNSC-Kohorte, eine Verbesserung des Gesamtüberlebens bei erhöhter Immuninfiltration.



**Abbildung 15: Prognostische Aussagekraft der Immunezellinfiltration der Makrophagen-Subtypen innerhalb der UKS-Kohorte.** Nach immunhistochemischer Analyse des intra- und peritumoralen Kompartiments erfolgte für die, von ehemaligen Doktoranden der Arbeitsgruppe gefärbten, Makrophagen-Subtypen eine Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Patienten. Dargestellt sind die Analysen der Immunezellinfiltration der (A) M1-Makrophagen (CD11+) und (B) M2-Makrophagen (CD163+). Statistik: log-rank-Test; die p-Werte sind neben den Kaplan-Meier-Kurven angegeben. Die vertikalen Linien auf den Kaplan-Meier-Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

Die Validierung der prognostischen Analysen der M1 und M2 tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) Subtypen in der UKS-Kohorte erfolgte nach Überlassung der Daten durch vorherige Doktoranden der Arbeitsgruppe, simultan zu den vorherigen Auswertungen. Die M1-Makrophagen, detektiert durch eine gegen CD11 gerichtete immunhistochemische Färbung, zeigten sowohl intratumoral wie auch peritumoral keine signifikante Veränderung der Prognose (siehe Abbildung 15A). Die M2-Makrophagen, detektiert durch eine gegen CD163 gerichtete immunhistochemische Färbung, zeigten intratumoral eine signifikante Assoziation mit einem verbesserten Gesamtüberleben bei niedrigem Infiltrationsniveau der CD163-positiven M2-Makrophagen ( $p=0,036$ ; siehe Abbildung 15B). Peritumoral zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Prognose.

#### 4.3.2 Prognostische Relevanz klinischer Charakteristika innerhalb der UKS-Kohorte

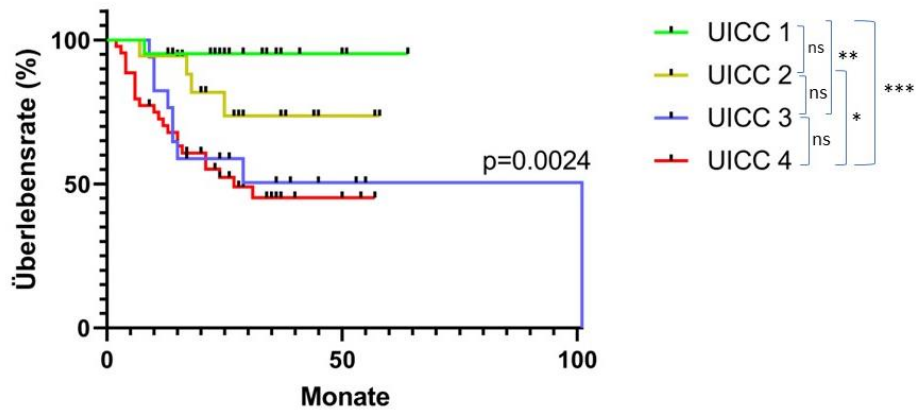


**Abbildung 16: Prognostische Aussagekraft des HPV-Tumorstatus und der Vitamin-D-Versorgung innerhalb der UKS-Kohorte.** Gesamtüberleben der Patienten der Validierungskohorte eingeteilt durch (A) HPV-Tumorstatus. HPV-Positivität definierte sich hierbei durch die Kombination aus positiver p16-Immunhistochemie und positiver HPV-DNA-PCR. (B) Gesamtüberleben der Validierungskohorte eingeteilt anhand des Vitamin-D-Status. Eine ausreichende Vitamin D-Versorgung wurde durch ein 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel von  $\geq 10$  ng/ml definiert. Statistik: log-rank-Test; die p-Werte sind neben den Kaplan-Meier-Kurven angegeben. Die vertikalen Linien auf den Kaplan-Meier-Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

Im Rahmen der Validierung der RNAseq Daten der TCGA-Kohorte erfolgten Korrelationen histopathologischer Charakteristika sowie weiterer Merkmale der UKS-Kohorte mit dem Gesamtüberleben der Patienten. Wie in Abbildung 16A dargestellt zeigten HPV-positive Patienten ( $n=18$ ), definiert durch die Kombination einer positiven p16-Immunhistochemie und einer positiven HPV-DNA-PCR, ein verbessertes Gesamtüberleben im Vergleich zu HPV-negativen Patienten ( $n=83$ ,  $p=0,0079$ ). Auch der Vitamin D-Status der Patienten zeigte einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten (vgl. Abbildung 16B). Hierbei konnte jedoch kein signifikanter prognostischer Effekt ( $p=0,0798$ ), sondern nur eine Tendenz hin zur Prognoseverbesserung im Falle einer ausreichenden Vitamin D Versorgung (25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel  $>10$  ng/ml) der Patienten festgestellt werden.



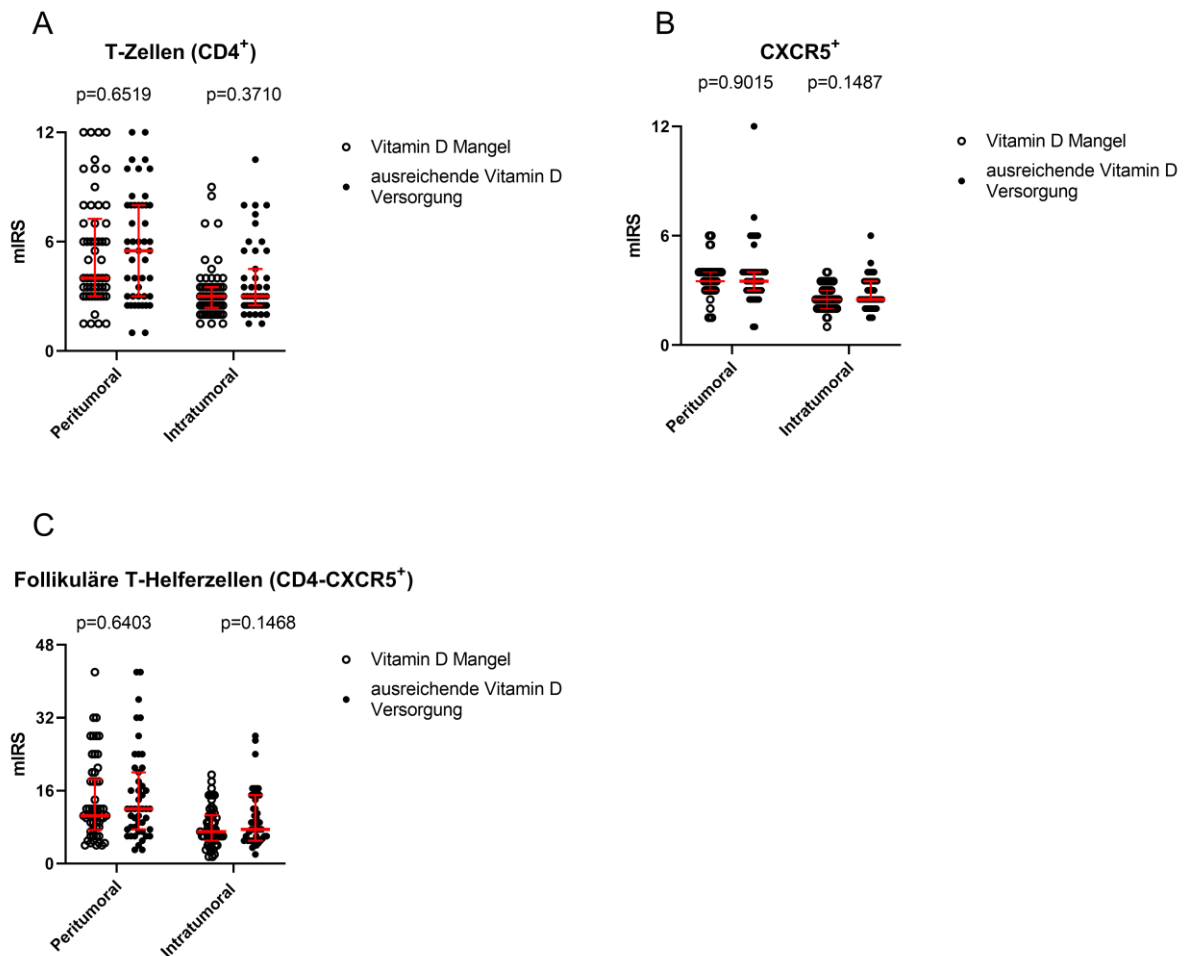
### Prognostische Relevanz UICC- Stadium



**Abbildung 17: Prognostische Aussagekraft UICC Stadien innerhalb der UKS-Kohorte.** Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit der UICC-Stadien der 8. Version der TNM-Klassifikation. Statistik: log-rank-Test; die P-Werte sind neben den Kaplan-Meier-Kurven angegeben. Die vertikalen Linien auf den Kaplan-Meier-Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

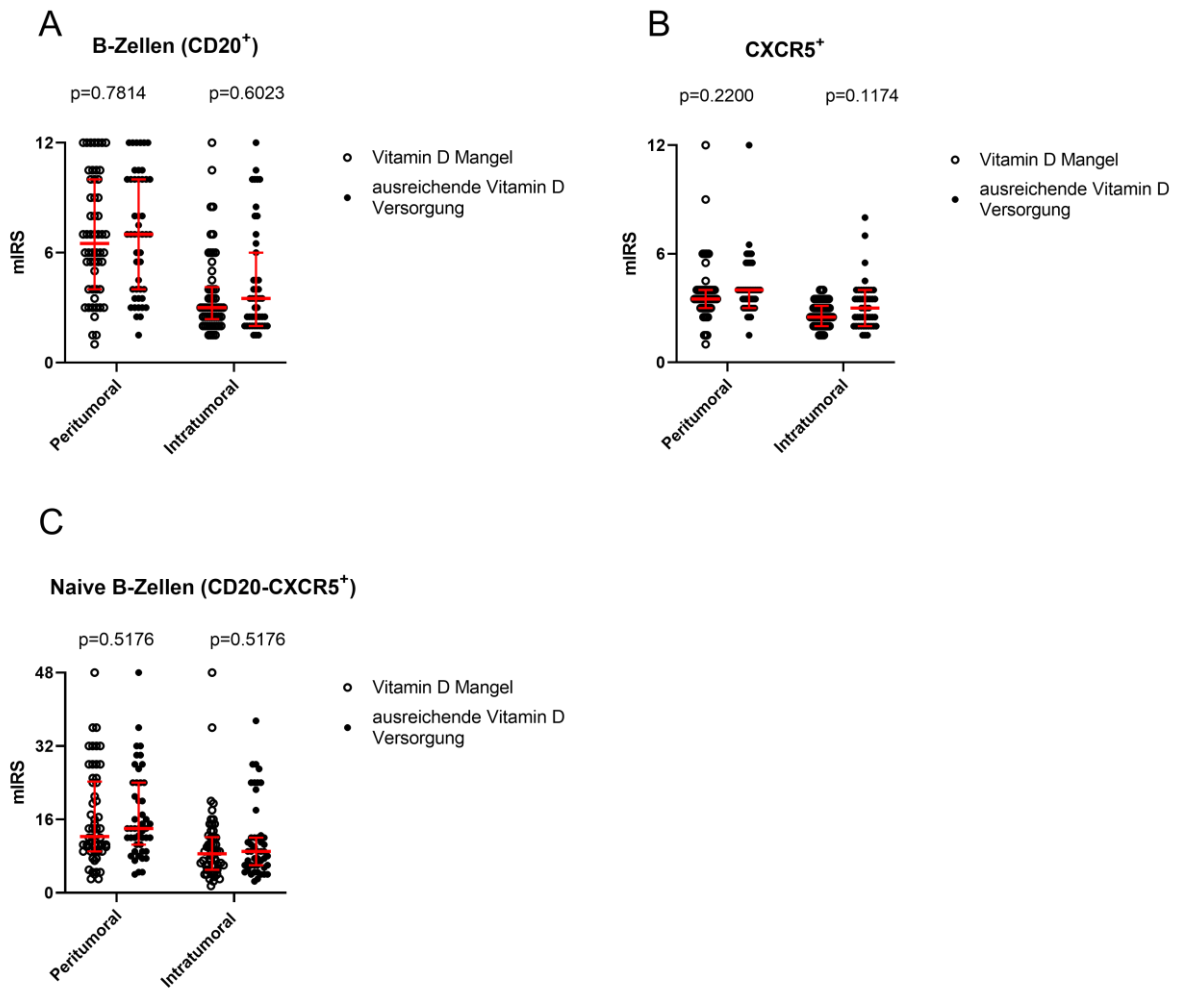
Das Gesamtüberleben der Patienten hing, wie in Abbildung 17 zu sehen, zudem signifikant von dem jeweiligen UICC-Stadium ab ( $p=0,0024$ ). Patienten mit dem UICC-Stadium 1 zeigten hierbei das beste Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit Stadium 3 ( $p=0,0039$ ) und Stadium 4 ( $p=0,0007$ ). Zusätzlich zeigten Patienten, die dem Stadium 2 angehörten, eine signifikant bessere Prognose im Vergleich zu Patienten mit UICC-Stadium 4 ( $p=0,0436$ ). Vergleiche zwischen den UICC-Stadien 1 und 2, 2 und 3, sowie 3 und 4 zeigten keine signifikanten Unterschiede bzgl. des Gesamtüberlebens der Patienten.

### 4.3.3 Einfluss des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels auf die Immunzellinfiltration



**Abbildung 18: Einfluss des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels auf die Immunzellinfiltration des Tumormikromilieus im Rahmen der CD4-CXCR5 Färbung.** Analyse der Immunzellinfiltration (aufgeteilt in intratumoral und peritumoral) in Abhängigkeit des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels (Vit. D-Mangel (25-OH-Vitamin-D <10 ng/ml) vs. ausreichende Vitamin-D-Versorgung (25-OH-Vitamin-D  $\geq$ 10 ng/ml)) der (A) T-Zellen (B) CXCR5 Teilfärbung und der (C) Follikulären T-Helferzellen. In (A) bis (C) wird der Median durch die horizontale Linie und der Interquartils-Abstand durch die Fehlerbalken angezeigt. Statistik: Mann-Whitney Test. Die p-Werte sind über den jeweiligen Abbildungen angegeben.

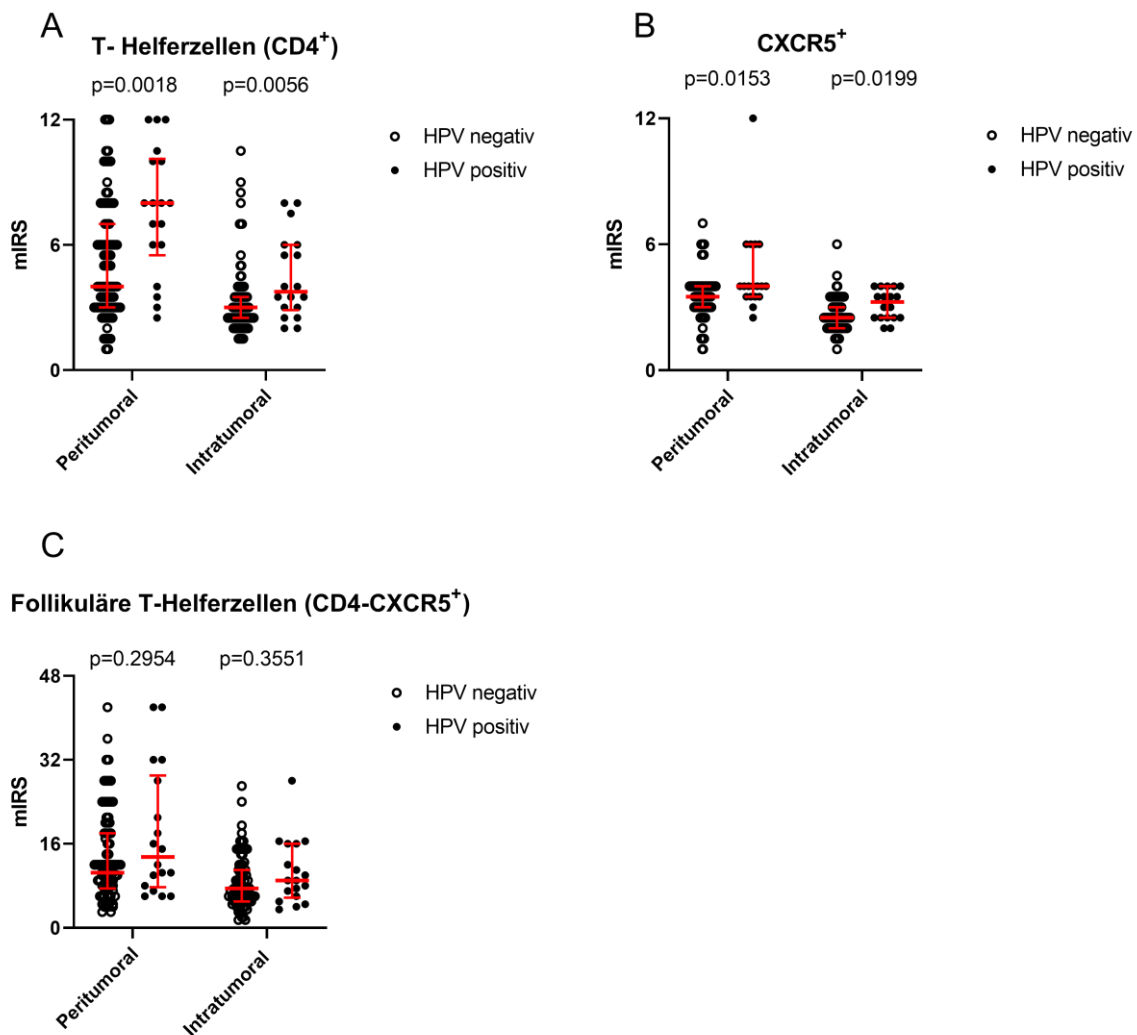
Zusätzlich wurde im Rahmen der prognostischen Analysen des UKS-Patientenkollektivs der Einfluss des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels auf die Infiltration mit den verschiedenen Immunzellpopulationen untersucht (siehe Abbildung 18). Hierzu erfolgte eine Einteilung des Patientenkollektivs in Patienten mit ausreichender Vitamin D-Versorgung (25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel  $\geq$ 10 ng/ml) und Patienten mit einem Vitamin D-Mangel (25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel < 10 ng/ml). Der 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel zeigte für die CD4-CXCR5-Färbung keine signifikante Beeinflussung des mIRS, weder für die Einzelfärbungen noch für die Doppelfärbung. Eine Tendenz hin zu einem höheren mIRS bei ausreichender Vitamin-D-Versorgung konnte lediglich bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen peritumoral (vgl. Abbildung 18A) und den follikulären T-Helferzellen peritumoral (vgl. Abbildung 18C) beobachtet werden.



**Abbildung 19: Einfluss des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels auf die Immunzellinfiltration des Tumormikromilieus im Rahmen der CD20-CXCR5 Färbung.** Analyse der Immunzellinfiltration (aufgeteilt in intratumoral und Peritumoral) in Abhängigkeit des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels (Vit. D-Mangel (25-OH-Vitamin-D <10 ng/ml) vs. ausreichende Vitamin D Versorgung (25-OH-Vitamin-D >10 ng/ml)) der (A) B-Zellen (B) CXCR5 Teilfärbung und der (C) naiven B-Zellen. In (A) bis (C) wird der Median durch die horizontale Linie und der Interquartils-Abstand durch die Fehlerbalken angezeigt. Statistik: Mann-Whitney Test. Die p-Werte sind über den jeweiligen Abbildungen angegeben.

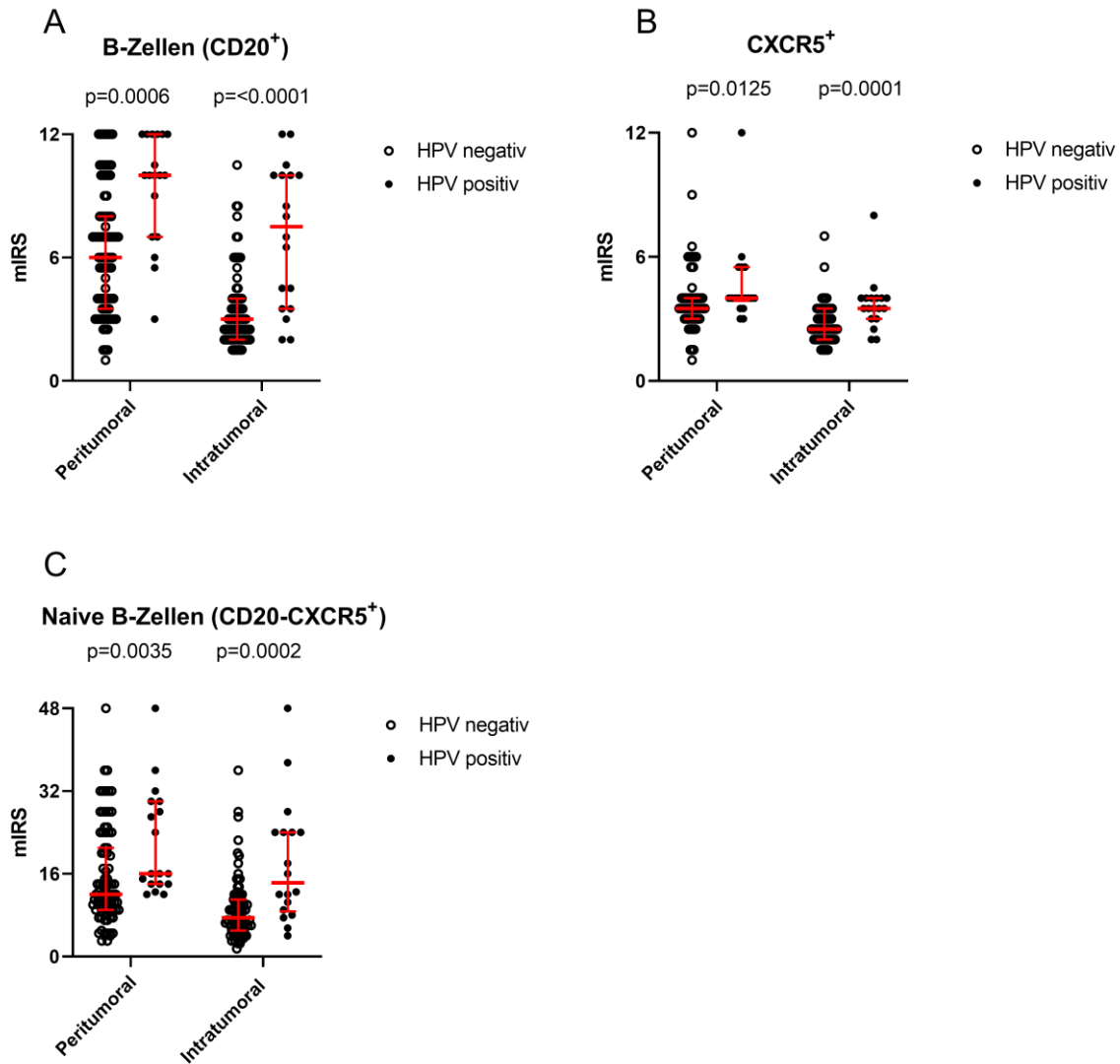
Simultan zur CD4-CXCR5 Doppelfärbung erfolgte die Analyse des Einflusses des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels auch für die CD20-CXCR5 Doppelfärbung (siehe Abbildung 19). Hierbei zeigte sich ebenfalls keine signifikante Veränderung des mIRS durch den Vitamin-D-Status. Eine leichte Tendenz zu einem höherem mIRS bei ausreichender Vitamin-D-Versorgung konnte jedoch im Rahmen der intratumoralen und peritumoralen CXCR5 Teilfärbung, der peritumoralen CD20+ B-Zell-Färbung und im peritumoralen Stroma der naiven B-Zell Färbung nachgewiesen werden.

#### 4.3.4 Einfluss des HPV- Tumorstatus auf die Immunzellinfiltration



**Abbildung 20: Einfluss des HPV-Tumorstatus auf die Immunzellinfiltration des Tumormikromilieus im Rahmen der CD4-CXCR5 Färbung.** Analyse der Immunzellinfiltration (aufgeteilt in intratumoral und peritumoral) in Abhängigkeit des HPV-Tumorstatus (HPV positiv = p16 IHC + HPV DNA PCR Positivität, n=18; HPV negativ: n=83) der (A) T-Helferzellen, (B) CXCR5 Teilfärbung und der (C) follikulären T-Helferzellen. In (A) bis (C) wird der Median durch die horizontale Linie und der Interquartils-Abstand durch die Fehlerbalken angezeigt. Statistik: Mann-Whitney Test. Die p-Werte sind über den jeweiligen Abbildungen angegeben.

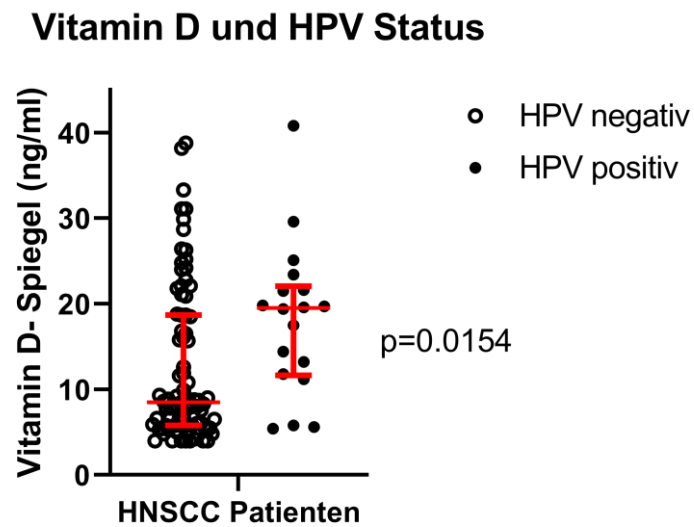
Zusätzlich erfolgte die Analyse des Einflusses des HPV-Tumorstatus auf die Infiltration mit den verschiedenen Immunzellpopulationen. Auch für diese Analyse wurde HPV-Positivität als Kombination einer positiven HPV-DNA-PCR und einer positiven p16 Immunhistochemie gewertet. Im Rahmen der CD4-CXCR5 Doppelfärbung konnte ein signifikanter Anstieg des mIRS bei HPV positiven Patienten, sowohl intra- wie auch peritumoral, in der T-Helferzell Teilfärbung (siehe Abbildung 20A) sowie in der CXCR5 Teilfärbung (siehe Abbildung 20B) beobachtet werden. Die follikulären T-Helferzellen zeigten keine signifikante Veränderung, jedoch eine Tendenz zu einem erhöhtem mIRS bei positivem HPV-Tumorstatus (siehe Abbildung 20C).



**Abbildung 21: Einfluss des HPV-Tumorstatus auf die Immuzellinfiltration des Tumormikromilieus im Rahmen der CD20-CXCR5 Färbung.** Analyse der Immuzellinfiltration (aufgegliedert in intratumoral und peritumoral) in Abhängigkeit des HPV-Tumorstatus (HPV positiv = p16 IHC + HPV DNA PCR Positivität, n=18; HPV negativ: n=83) der (A) B-Zellen (B) CXCR5 Teilfärbung und der (C) naiven B-Zellen. In (A) bis (C) wird der Median durch die horizontale Linie und der Interquartils-Abstand durch die Fehlerbalken angezeigt. Statistik: Mann-Whitney Test. Die p-Werte sind über den jeweiligen Abbildungen angegeben.

Die CD20-CXCR5 Doppelfärbung zeigte ähnlich wie die CD4-CXCR5 Doppelfärbung einen signifikanten Anstieg des mIRS bei positivem HPV-Status. Hierbei waren intra- und peritumoral ein signifikanter Anstieg des mIRS in Rahmen der CD20+ B-Zell Teilfärbung, der CXCR5 Teilfärbung sowie der Doppelfärbung der naiven B Zellen zu beobachten (siehe Abbildung 21).

#### 4.3.5 Einfluss des HPV-Tumorstatus auf den 25-OH-Vitamin D-Serumspiegel



**Abbildung 22: Einfluss des HPV-Tumorstatus auf den 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel innerhalb des UKS-Patientenkollektivs.** Analyse der Abhängigkeit des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels (in ng/ml) vom HPV-Tumorstatus (HPV positiv = p16 IHC + HPV DNA PCR Positivität, n=18; HPV negativ: n=83). Der Median wird durch die horizontale Linie und der Interquartils-Abstand durch die Fehlerbalken angezeigt. Statistik: Mann-Whitney Test. Der p-Wert ist neben der Abbildung angegeben.

Um eine potenzielle Beeinflussung der klinischen Parameter untereinander zu analysieren, wurde der Einfluss des HPV-Status auf den 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel in der UKS-Validierungskohorte untersucht. Wie Abbildung 22 zeigt, konnte hierbei ein signifikant erhöhter 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel bei HPV-Positivität nachgewiesen werden ( $p=0,0154$ ).

## 5 Diskussion

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals Region stellen eine der am stärksten immuninfiltrierten, humanen Tumorentitäten dar. Nichtsdestotrotz zeigen sich vergleichsweise niedrige Ansprechraten auf PD1- Immuncheckpoint Inhibitoren (QIAO et al., 2020) und eine weiterhin schlechte 5 Jahres-Überlebensrate zwischen 50-60% (JOHNSON et al., 2020). In dem sich schnell entwickelnden Gebiet der Immuntherapie verdeutlichen diese Aspekte des therapeutischen Managements von Kopf-Hals Tumoren die Notwendigkeit neuer und besserer, prognostischer und prädiktiver Biomarker sowie neuer Therapiestrategien (ALMANGUSH et al., 2021; MANDAL et al., 2016). Neben der tumoralen Mutationslandschaft der HNSCCs beeinflusst die Zusammensetzung des immunologischen Tumormikromilieus die Therapieansprechraten sowie die Prognose von HNSCC Patienten wesentlich (ECONOMOPOULOU et al., 2020). Aufgrund dessen erfolgte in der vorgelegten Arbeit die Analyse von 29, das immunologische Tumormikromilieu charakterisierenden Immunparametern der TCGA-HNSC Kohorte, basierend auf RNAseq- Immundekonvolution-Daten, und die Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Patienten. Die signifikantesten Prädiktoren einer verbesserten Prognose wurden dann immunhistochemisch an einer zweiten, institutseigenen, 101 Patienten großen Kohorte validiert. Hierbei zeigten sieben Immunparameter, u.a. der Lymphocytes Infiltration Signature Score (LISS), folliculäre T-Helferzellen, naive B-Zellen, zytotoxische T-Zellen, Lymphozyten, Makrophagen und regulatorische T-Zellen eine hochsignifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben innerhalb der TCGA-Kohorte. Diese prognostische Relevanz bestätigte sich immunhistochemisch in der Validierungskohorte im Falle der Gesamt-Lymphozytenpopulation, der folliculären T-Helferzellen, und der zytotoxischen T-Zellen mit der höchsten Signifikanz für die peritumorale Infiltration mit folliculären T-Helferzellen.

Insgesamt spiegeln diese Ergebnisse im Wesentlichen den fachliterarischen Konsens auf dem Gebiet der Kopf-Hals Immunonkologie wider, und unterstreichen die zunehmende Erkenntnis, dass die prognostische Bedeutung des immunologischen TMEs differenzierter betrachtet werden muss (QIN et al., 2021; WONDERGEM et al., 2020). Hierzu ist die Diversität der Immunzellen mit proinflammatorischen und immunsuppressiven Effekten, sowie die hochkomplexe Interaktion der Immunzellen mit den Tumorzellen selbst und weiteren zellulären Bestandteilen des immunologischen Tumormikromilieus, wie den tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF), zu beachten (BIENKOWSKA et al., 2021; KANG et al., 2021). Infolgedessen zeigt Abbildung 8, wenig überraschend, keine signifikanten Auswirkungen des gesamten zellulären Netzwerks des immunologischen TME in Form des ESTIMATE-IMMUNE Scores und des CYT-Scores auf das Gesamtüberleben der Patienten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein differenzierterer Blick auf die verschiedenen Immunzellsubtypen und deren spezifische Aktivität notwendig ist. In dieser Arbeit zeigten, auf der Grundlage der RNAseq-Immundekonvolutions-Daten der TCGA-HNSC-Kohorte, der Lymphocytes infiltration signature Score (LISS), die folliculären T-Helferzellen, die naiven B-Zellen, die zytotoxischen T-Zellen und Lymphozyten bei hohem Infiltrationsniveaus des Tumorgewebes die signifikanteste Korrelation mit

einem verbesserten Gesamtüberleben. Gegensätzlich hierzu zeigten Makrophagen bei niedrigem Infiltrationsniveau des Tumorgewebes eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens der Patienten in der TCGA-Kohorte. Vergleichbar mit dem Studien-Design in dieser Promotionsarbeit untersuchten die Autoren *Mandal et al.* und *Wongergem et al.* die prognostische Bedeutung diverser Immunzellen in der TCGA-Kohorte, sowie in weiteren unabhängigen Patientenkollektiven (MANDAL et al., 2016; WONDERGEM et al., 2020). Die Unterschiede dieser Promotionsarbeit zur Arbeit von *Mandal et al.* zeigen sich u.a. in der Anzahl der eingeschlossenen Patienten (Mandal et al: n=280, diese Arbeit: n=513), sowie in der Anzahl der untersuchten Immunparameter (Mandal et al: n=34, diese Arbeit: n=29). Zusätzlich fallen Unterschiede in den Immundekonvolutions-Daten auf. Als Grundlage für die statistische Bewertung der prognostischen Relevanz des immunologischen TME wurden in dieser Arbeit die von *Thorsson et al.* (THORSSON et al., 2018) publizierte RNAseq-basierten Immundekonvolutions-Daten genutzt, während *Mandal et al.* eigene Immundekonvolutions-Algorithmen programmiert hatten, um basierend auf den RNAseq Rohdaten des TCGA Projekts eine differenzierte Aussage über die einzelnen Immunzellsubpopulationen treffen zu können (MANDAL et al., 2016). In der von *Wongergem et al.* publizierten Arbeit handelt es sich um eine Metaanalyse, so dass hier keine eigenen Daten generiert wurden, sondern die bisher verfügbaren Arbeiten zur prognostischen Relevanz der verschiedenen Immunzellpopulationen in Kopf-Hals-Karzinomen zusammengefasst und miteinander verglichen wurden. Diese Metaanalyse zeigte entsprechend ebenfalls eine unterschiedliche Anzahl der untersuchten Immunzellparameter (Wongergem et al: n=15, diese Arbeit: n=29) auf, und unterschied sich weiterhin durch die Untersuchung diverser Immunzellratios (bspw. CD8/CD4- oder CD8/Foxp3 Verhältnis) (WONDERGEM et al., 2020). Das Alleinstellungsmerkmal der vorgelegten Arbeit besteht somit in der zusätzlichen immunhistochemischen Validierung der auf Grundlage der TCGA RNAseq-Daten erhobenen, prognostischen Bewertung an einer unabhängigen Kohorte von n=101 Patienten sowie in den zusätzlichen Analysen des Einflusses histopathologischer und klinischer Charakteristika der TCGA- und UKS-Kohorte auf die Prognose der Patienten und die Immunzellinfiltration innerhalb des Tumormikromilieus. Vor dem Hintergrund der großen methodischen Vielfalt zur Immundekonvolution aus bulk RNAseq-Daten zur differenzierten Analyse des immunologischen TME in humanen Tumoren, sowie der in Kopf-Hals-Tumoren ausgeprägten intertumoralen Heterogenität erscheint ein solcher Validierungsschritt mit einer anderen Methodik an einem unabhängigen Patientenkollektiv als ein wichtiger Schritt, um die Validität der generierten Daten und daraus abgeleiteten Aussagen relevant verbessern zu können.

Bei genauer Betrachtung der einzelnen Immunzellsubpopulationen bestätigt sich das in dieser Arbeit gezeigte, verbesserte Gesamtüberleben im Falle einer erhöhten, lymphozytären intra- und peritumoralen Infiltration durch eine Vielzahl von Studien, die einen positiven Einfluss der tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) auf das Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten bestätigen konnten (ALMANGUSH et al., 2022; ZHANG et al., 2021). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass hohe Infiltrationsniveaus an TIL verbesserte Ansprechraten auf Chemotherapien bedingen, was TILs nicht



nur zu attraktiven, prognostischen sondern auch prädiktiven Biomarkern von Kopf-Hals Tumoren macht (SUZUKI et al., 2022). Trotz der prädiktiven und prognostischen Bedeutsamkeit der tumorinfiltrierenden Lymphozyten fehlt es, wie von *Xu et al* gezeigt, an standardisierten und leicht anwendbaren Methoden zur Bewertung des TIL-Gehalts in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region, was die Notwendigkeit einer einheitlichen Messmethode zur Erfassung des TIL Levels unterstreicht (XU et al., 2017).

Die folliculären T-Helferzellen zeigten im Rahmen dieser Arbeit bei erhöhtem Infiltrationsniveau des Tumorgewebes eine signifikante Verbesserung der Patientenprognose und stellten sich so unter allen analysierten Immunparametern als signifikantesten Prädiktor des Überlebens dar. Die molekulare Funktion der folliculären T-Helferzellen, in Form eines B-Zell-Stimulators zur Potenzierung der humoralen Immunantwort erklärt das in einigen Studien nachgewiesene, verbesserte Gesamtüberleben im Falle eines erhöhten Levels an folliculären T-Helferzellen im Tumormikromilieu diverser solider Tumorentitäten (BAUMJOHANN, BROSSART, 2021). Darüber hinaus gibt es Belege dafür, dass die interzelluläre Kommunikation innerhalb des TME, in Form des CD8+ /folliculären T-Helferzellen Crosstalks, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, der durch die Immuntherapie ausgelösten antitumoralen Immunantwort spielt (NIOGRET et al., 2021). Für Kopf-Hals Karzinome konnten *Cillo et al.* ein verbessertes progressionsfreies Überleben bei erhöhter Konzentration der CD4+ folliculären T-Helferzellen im Tumormikromilieu nachweisen (CILLO et al., 2020). Gleichsam mit den Resultaten dieser Promotionsarbeit unterstreichen die beschriebenen Studien das vielversprechende Potenzial der folliculären T-Helferzellen als prognostischer Biomarker in Kopf-Hals Tumoren sowie, aufgrund der Beteiligung an der humoralen und zellulären, antitumoralen Immunabwehr, den potenziellen Nutzen dieser Immunzellsubpopulation als Ziel künftiger, immuntherapeutischer Ansätze.

Im Falle der naiven B-Zellen, die sich ebenfalls als Prädiktor einer verbesserten Prognose in der TCGA-HNSC Kohorte erwiesen, beschäftigten sich bisher nur wenige Studien mit der Untersuchung der molekularen Funktion und den prognostischen Auswirkungen dieser Immunzellsubpopulation auf Kopf-Hals Karzinom Patienten. Neuere Studien konnten jedoch eine tumorzellbedingte Chemotaxis und Differenzierung der naiven B-Zellen in das Tumormikromilieu zeigen, indem ihre immunsuppressiven Eigenschaften stimuliert werden und dadurch die antitumorale Immunreaktion abgeschwächt wird (SARVARIA et al., 2017). Diese Ergebnisse stehen auf den ersten Blick im Widerspruch zu der in dieser Arbeit aufgezeigten, prognoseverbessernden Eigenschaft der naiven B-Zellen in der TCGA-HNSC Kohorte. In anderen Tumorentitäten, wie Neuroblastomen, konnten jedoch naive B-Zellen als der beständigste Indikator für eine gute Prognose und einer aktiven antitumoralen Immunmikroumgebung identifiziert werden (SCHAAFSSMA et al., 2021). Aufgrund dessen benötigt es weitere Studien auf dem Gebiet der Kopf-Hals Immunonkologie, um die prognostischen und molekularen Eigenschaften dieser Immunzellsubpopulation gänzlich aufzudecken. Neben der prognostischen Wertigkeit als Biomarker stellen die diversen B-Zell Phänotypen innerhalb des Tumormikromilieus einen weiteren Ansatzpunkt

für zukünftige Immuncheckpoint-Inhibitor Therapien dar. Beispielsweise konnten *Ruffin et al.* nachweisen, dass Melanom-Patienten, die nicht auf die Standardimmuntherapie in Form einer Anti-PD1 und/oder Anti-CTLA4- Therapie ansprachen, ein signifikant höheres Level an naiven B-Zellen innerhalb des TME aufwiesen als Patienten, die auf die Immuntherapie ansprachen. Ein Versuch zur Initiierung der Differenzierung der naiven, tumorinfiltrierenden B-Zellen hin zu Keimzentrum-Phänotypen könnte so eine Möglichkeit darstellen die derzeitigen immuntherapeutischen Strategien zu komplementieren (RUFFIN et al., 2021).

Deutlich kohärenter und mit höherer wissenschaftlicher Evidenz beschreibt die medizinische Fachliteratur die prognostische Bedeutung der zytotoxischen T-Zellen. Eine positive Korrelation eines verbesserten Gesamtüberlebens mit einer erhöhten Tumordinfiltration durch zytotoxische T-Zellen, wie sie in dieser Arbeit sowohl für die TCGA-HNSC-Kohorte wie auch für die Validierungskohorte gezeigt wurde, steht im Einklang mit zahlreichen Publikationen, die ein verbessertes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben bei hoher Infiltration von HNSCCs mit zytotoxischen T-Zellen beschreiben (BORSETTO et al., 2021; DE RUITER et al., 2017; SHIMIZU et al., 2019). Im Rahmen der Evaluierung der prognostischen Bewertung der zytotoxischen T-Zellen ist weiterhin die komplexe, interzelluläre Kommunikation der zytotoxischen T-Zellen mit anderen Bestandteilen des immunologischen TME, wie beispielsweise die Interaktion zwischen zytotoxischen T-Zellen und FoxP3+ regulatorischen T-Zellen, repräsentiert durch das CD8/FoxP3 Verhältnis zu beachten (DE RUITER et al., 2017), was die Robustheit und Gültigkeit von CD8+ T-Zellen als Biomarker für ein verbessertes klinisches Outcome bei Kopf- und Halstumoren weiter unterstreicht (DE RUITER et al., 2017; LEQUERICA-FERNÁNDEZ et al., 2021; NÄSMAN et al., 2012). Hauptangriffspunkte bereits etablierter Immuntherapien stellen die Immuncheckpoint-Rezeptoren PD-1 und CTLA4 auf der Oberfläche von u.a. zytotoxischen T-Zellen dar, deren Blockade, durch diverse monoklonale Antikörper, zur Verhinderung einer Immunevasion beziehungsweise zu einer gesteigerten Effizienz der antitumoralen Immunantwort und Revitalisierung der zytotoxischen T-Zellen führt (RASKOV et al., 2021; XIANG et al., 2023). Zwischen 2011 und 2018 erfolgte die Zulassung der drei PD-1 Inhibitoren Pembrolizumab, Nivolumab und Cemiplimab sowie der PD-L1 Inhibitoren Atezolizumab, Avelumab und Durvalumab zur Therapie 14 verschiedener Tumorentitäten, u.a. Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs, durch die FDA in den USA und teilweise auch in Europa (RASKOV et al., 2021). Trotz anfänglicher Erfolge der Immuncheckpoint-Therapie, zeigten die niedrigen Ansprechraten die Notwendigkeit weiterer immuntherapeutischer Targets auf. Durch weitere Studien konnten u.a. das lymphocyte activation gene 3 (LAG3), das T cell immunoglobulin 3 (TIM3) und der V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation (VISTA) als negative Regulatoren der T-Zell Aktivierung entdeckt werden und stellen somit potenzielle Ziele neuer immuntherapeutischer Ansätze dar mit zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen als wesentlichen Zielstrukturen (WALDMAN et al., 2020). Die Ergebnisse diverser Multicenter Studien bezüglich der antitumoralen Wirkung des Tim-3 Inhibitors Cobolimab in Melanompatienten (NCT04139902), sowie bezüglich der antitumoralen

Wirkung des gegen LAG3 gerichteten, monoklonalen Antikörpers RO7247669 bei fortgeschrittenen/metastasierten soliden Tumoren (NCT04140500), werden in den Jahren 2025 und 2027 erwartet.

Eine potenzielle Erklärung des in der TCGA-Kohorte beobachteten schlechteren Gesamtüberlebens bei verstärktem Infiltrationsniveau des Tumors mit tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) findet sich in einer unausgeglichene Verteilung der proinflammatorischen M1- und der immunsuppressiven M2-Makrophagen (KUMAR et al., 2019). Eine erhöhte Dichte des M2-Subtypes der tumor-assoziierten Makrophagen innerhalb des TME von HNSCCs ist wie von *Kumar et al.* gezeigt, mit einem fortgeschrittenen T-Stadium, verstärktem Lymphknotenbefall, vaskulärer Beteiligung und dem Vorhandensein einer lymphatischen Invasion assoziiert (KUMAR et al., 2019). Unterstrichen werden diese Ergebnisse durch die Studie von *Costa et al.* die eine Korrelation eines Übergewichts an M2 TAM im Tumormikromilieu von OPSCCs mit einem lokalen, durch TGF- $\beta$  Produktion ausgelöstem, immunsuppressivem Milieu und einem verstärkten Lymphknotenbefall, sowie einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten feststellen konnten (COSTA et al., 2013). Im Gegensatz zu der Vielzahl an publizierten Studien, die den prognostischen Einfluss der M2 TAMs untersuchen, beschäftigen sich nur wenige Studien mit den Auswirkungen des M1-Subtyps auf die Prognose von HNSCC Patienten, was u.a. an den unzuverlässigen, immunhistochemischen Ergebnissen des weithin bekannten M1-Markers iNOS, sowie der Unspezifität des häufig verwendeten M1-Markers CD11c liegt (BISHESHAR et al., 2022). Trotz Fehlens eines robusten M1-TAM Markers, konnte *Agarbati et al.* ein verbessertes disease free survival bei erhöhter Expression der CD11c+ M1-Makrophagen in HNSCC Patienten nachweisen (AGARBATI et al., 2021). Bei der separaten Betrachtung des Gesamtüberlebens der M1 und M2 TAM-Subtypen innerhalb der TCGA-HNSC Kohorte (siehe Abbildung 7 B+C) konnte jedoch keine prognostische Relevanz für die beschriebenen Subtypen beobachtet werden. Nur in der Validierungskohorte konnte ein erhöhtes Infiltrationsniveau an M2-Makrophagen innerhalb des intratumoralen Kompartiments eine Assoziation mit einem schlechteren Gesamtüberleben aufweisen (siehe Abbildung 15). Diese Ergebnisse spiegeln die komplexe Funktion der Makrophagen in der antitumoralen Immunität wider, bei der in Abhängigkeit des molekularen Kontexts und der Tumorentität sowohl immunsuppressive wie auch immunstimulierende Effekte zu beobachten sind (ZHU et al., 2021). Durch die zentrale Rolle der verschiedenen TAM-Phänotypen in der antitumoralen Immunabwehr, zielen neue immuntherapeutische Strategien auf einen Switch der immunsuppressiven M2-Subtypen hinzu einem antitumoralen M1-Subtyp ab (CAI et al., 2021). Hauptangriffsziele dieser molekularen Reprogrammierung stellen der Toll-like Rezeptor 7 (TLR7), TLR8, TLR9, CD40, histone deacetylase (HDAC), PI3K $\gamma$ , CSF1, und CSF1 Rezeptor (CSF1R) dar, wobei die CSF1/CSF1R Achse die attraktivste Option in aktuellen klinischen Studien darstellt (BART et al., 2021). Eine erste Phase I Studie zur Reprogrammierung von tumor-assoziierten Makrophagen mittels exoASO-STAT6 (CDK-004) in metastasierten Leberzellkarzinom Patienten konnte letztes Jahr begonnen werden (NCT05375604) (KAMERKAR et al., 2022). Trotz der erst neu entwickelten, immuntherapeutischen

Herangehensweise zeigten sich bereits erste Nebenwirkungen in Form einer Hochregulation der PD-L1 Expression der umprogrammierten Makrophagen, die eine funktionelle Erschöpfung der Makrophagen und somit eine geschwächten antitumoralen Wirkung bedingt. Die Kombination einer Makrophagen-Reprogrammierung und PD-1/PD-L1 Blockade mit monoklonalen Antikörpern stellt hierbei eine vielversprechende Behandlungsstrategie dar (CAI et al., 2021).

Im Vergleich zu den Makrophagen ist die prognostische Relevanz der regulatorischen T-Zellen im Kontext der Karzinogenese von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region weiterhin weitestgehend unklar, was sich in der weiterhin bestehenden Diskrepanz der Ergebnisse der in den letzten Jahren publizierten Studien widerspiegelt (WONDERGEM et al., 2020). Die immunologische Funktion der regulatorischen T-Zellen zur Unterdrückung überschießender Immunreaktionen durch suppressiver Effekte auf zytotoxische T-Zellen und CD4+ Helferzellen sowie deren Beteiligung an der Immunevasion über die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 and TGF- $\beta$  beteiligt sich maßgeblich an der Entstehung eines immunsuppressiven Tumormikromilieus (ECONOMOPOULOU et al., 2020). Diese immunsuppressive Funktion der Tregs könnte eine Erklärung der in der TCGA-Kohorte beobachteten Assoziation eines schlechteren Gesamtüberlebens bei erhöhter Infiltration mit regulatorischen T-Zellen sein (siehe Abbildung 5C). Das Ergebnis der TCGA-Kohorte konnte innerhalb der UKS-Kohorte nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 14C) und zeigte sogar einen inversen Trend mit einer Tendenz zu einem verbesserten Gesamtüberleben bei erhöhten intra- und peritumoralen Infiltrationsniveaus mit regulatorischen T-Zellen. Weitere Studien wie *Mandal et al.* konnten die prognostischen Ergebnisse innerhalb der UKS-Kohorte, nach Anpassungen des HPV-Status, der CD8+ T-Zellen und der CD56dim NK-Zell-Infiltration mit einem verbesserten Gesamtüberleben bei erhöhter Infiltration des Tumormikromilieus von HNSCC-Patienten weiter stützen (MANDAL et al., 2016). Trotz vieler publizierter Studien, die keinen prognoseverbessernden Effekt der Tregs zeigen (CHANG et al., 2019; LIANG et al., 2011; MAGGIONI et al., 2017), konnte, neben *Mandal et al.*, auch *Seminario et al.* ein verbessertes Gesamtüberleben bei erhöhtem Level an regulatorischen T-Zellen innerhalb des TME zeigen (SEMINERIO et al., 2019). Zusammenfassend zeigt sich kein klarer Konsens bezüglich der prognostischen Wertigkeit der regulatorischen T-Zellen in der Fachliteratur (ECONOMOPOULOU et al., 2020). Dennoch stellen Tregs einer der größten Subpopulationen der zellulären Komponenten des immunologischen TME dar (MANDAL et al., 2016), was zu weiteren Untersuchungen bezüglich ihrer prognostischen Relevanz und ihrer Eignung bezüglich zukünftiger, immuntherapeutischer Ansätze motivieren sollte. Mögliche immuntherapeutische Ansätze, die die regulatorischen T-Zellen als Zielstrukturen nutzen, sind im letzten Abschnitt dieser Diskussion beschrieben.

Die auf den ersten Blick widersprüchliche, für einzelne Immunzellsubtypen bestehende Diskrepanz der prognostischen Relevanz zwischen der TCGA- und UKS-Kohorte muss aus einem kritischen Blickwinkel heraus differenziert diskutiert werden. Trotz der übereinstimmenden prognostischen Effekte der zytotoxischen T-Zellen, folliculären T-Helferzellen und der Gesamt-

Lymphozytenpopulation, konnten weder die naiven B-Zellen und Makrophagen noch die regulatorischen T-Zellen dieselbe signifikante Relevanz in der Validierungskohorte wie in der TCGA-Kohorte erlangen. Eine potenzielle Erklärung der divergierenden Resultate könnte die vergleichsweise niedrige Anzahl der Patienten in der Validierungskohorte im Vergleich zur Anzahl der inkludierten Patienten in der TCGA-Kohorte, sowie in den verschiedenen, in der jeweiligen Kohorte genutzten Methoden zur Detektion der Immunzellsubpopulationen darstellen. Im Vergleich zur RNAseq Analyse, in der eine Vielzahl von Expressionsprofilen und Dekonvolutionstechniken zur Identifizierung und Quantifizierung von Immunzellsubpopulationen verwendet wurden, ist die Immunhistochemie auf ein oder zwei Biomarker zur Identifizierung eines vordefinierten Immunzellsubtyps beschränkt, sodass es nie zu einer perfekten Übereinstimmung zwischen den durch Next Generation Sequencing (NGS) und Immunhistochemie identifizierten Immunzellsubpopulationen kommen kann. Zudem befinden sich zahlreiche Immunzellen nicht in einem dauerhaft festgelegten Differenzierungsstadium, sondern können abhängig von der Mikroumgebung und Interaktionen mit anderen Zelltypen ihre Differenzierung wechseln, beispielsweise von M1 zu M2 Makrophagen oder von folliculären T-Helferzellen zu regulatorischen T-Zellen. Folglich können auch RNAseq basierte Immundekonvolutionsalgorithmen nicht mit letzter Sicherheit und umfassend alle Immunzellen einem eindeutigen Subtyp zuordnen. Der wesentliche Vorteil der Immunhistochemie besteht in diesem Kontext in der Möglichkeit, die Immunphänotypisierung auch einer entsprechenden Zytomorphologie zuordnen zu können, also zu sagen, ob ein beispielsweise positives Signal in der CD3-Immunfärbung auch von einer morphologisch als solche zu identifizierenden Immunzelle stammt. Darüber hinaus ist mit der Immunhistochemie eine exakte Lokalisation der Immunzellinfiltration, die wie in dieser Promotionsarbeit gezeigt wurde, einen erheblichen Einfluss auf die Prognose der Patienten hat, möglich, indem beispielsweise zwischen intra- und peritumoralem Immuninfiltrat unterschieden werden kann. In diesem Zusammenhang müssen jedoch auch die Auswahl und Spezifität der verwendeten IHC-Marker kritisch diskutiert werden. So exprimieren folliculäre T-Helferzellen neben CD4 und CXCR5 weitere Oberflächenmarker wie CD25, CD69, CD95 und CD57 (BRYANT et al., 2007; LAURENT et al., 2010), so dass es wohl keine zu 100% spezifische Markerkombination zur Detektion dieser Immunzellsubpopulation gibt. Zu beachten ist neben der allgemeinen Expression verschiedener Oberflächenmarker auch die Tumorentität, die durch unterschiedliche genetische und phänotypische Merkmale das Expressionsmuster der folliculären T-Helferzellen signifikant beeinflusst, was eine tumorentitätsspezifische Auswahl der die spezifischen Oberflächenproteine detektierenden Antikörper erforderlich macht (GUTIÉRREZ-MELO, BAUMJOHANN). Neben der durch *Ruffin et al.* durchgeführten Studie zur Detektion der folliculären T-Helferzellen in der Durchflusszytometrie mithilfe von CD4 und CXCR5 als Detektionsmarker, definierten auch weitere Studien wie die kürzlich publizierte Arbeit von *Turner et al.* die folliculären T-Helferzellen als CXCR5+CD4 Zellen, was trotz der unterschiedlichen Detektionsmethode die Auswahl der genutzten Oberflächenmarker in dieser Arbeit stützt (CROTTY, 2011; RUFFIN et al., 2021; TURNER et al., 2022). Die zweite immunhistochemische Färbung erfolgte mit der Kombination der

gegen die Oberflächenproteine CD20 und CXCR5 gerichteten Antikörper zur Detektion der naiven B-Zellen. Im Gegensatz hierzu detektierten anderen Studien im Rahmen durchflusszytometrischer Untersuchungen die naiven B Zellen als Kombination der Marker CD19+, IgD+, CD27-, CD38+/-, CD24+/- (SANZ et al., 2019). Dennoch stellt die Kombination des u.a. auf B-Zellen zu findenden Oberflächenprotein CXCR5 (HENNEKEN et al., 2005) und des B-Zell spezifischen Markers CD20 (KLÄSENER et al., 2021) eine adäquate Kombination zur Detektion der naiven B-Zellen dar, die auf dem Gebiet der Immunonkologie in wissenschaftlichen Studien häufig Anwendung findet. Letztlich haben sowohl die Immunhistochemie wie auch die RNA-Sequenzierung in der Untersuchung des Immuninfiltrats von humanen Tumoren Vor- und Nachteile, so dass beide Methoden ihre Berechtigung haben und abhängig von der jeweiligen Fragestellung gezielt ausgewählt und eingesetzt werden sollten. Obwohl in der klinisch-pathologischen Praxis die Immunhistochemie immer noch als Goldstandard in der Breite genutzt wird, werden aufgrund immer erschwinglicherer NGS-Methoden RNAseq-basierte Analysen des immunologischen TME zukünftig vermutlich Eingang in die klinische Routineanalyse von Tumorgewebeproben finden und die morphologisch-pathologische Diagnostik zumindest ergänzen.

Neben der Analyse der Auswirkung diverser Immunzellsubpopulationen des Tumormikromilieus auf das Gesamtüberleben erfolgte die Analyse des Einflusses klinischer und histopathologischer Charakteristika der TCGA- und UKS-Kohorte auf die Prognose der Patienten. Zur Untersuchung der Relevanz des HPV-Tumorstatus auf das Gesamtüberleben der Patienten innerhalb der TCGA-Kohorte erfolgte die Bestimmung des HPV-Status durch drei verschiedene Methoden: p-16 Immunhistochemie, HPV in-situ Hybridisierung und durch HPV PanCancerseq Daten (CAMPBELL et al., 2018). Mit der Fachliteratur übereinstimmend zeigte sich, unabhängig der genutzten Detektionsmethode, im Falle von HPV-Positivität ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben der Patienten in der TCGA-Kohorte (siehe Abbildung 11) (FAKHRY et al., 2008). Trotz der Empfehlung der WHO und IARC (Weltgesundheitsorganisation/Internationale Agentur für Krebsforschung) zur Durchführung einer von drei als gleichwertig angesehenen Detektionsmethoden (In-situ-Hybridisierung und/oder PCR und/oder Anti-p16-Immunchemie) (EL-NAGGAR et al., 2017), erfolgte unter Einbeziehung neuerer Studien, die Definition der HPV-Positivität in der UKS- Kohorte nur durch das Vorhandensein der Kombination aus einer positiven p16-Immunhistochemie und einer positiven HPV-DNA-PCR. Um bei der zunehmend an Bedeutung gewinnenden Strategie der Therapiedeeskalation bei HPV-assoziierten OPSCCs falsch-positive HPV-Testergebnisse zu vermeiden, war es in der vorgelegten Arbeit das vorrangige Ziel durch einen ergänzenden Nachweis von HPV-DNA zusätzlich zur p16-IHC eine möglichst spezifische Methode zur Untersuchung des Einflusses von HPV auf die individuelle Tumorbiologie zu erreichen (KÜHN et al., 2021). Eine kürzlich publizierte Multicenter-Studie konnte zeigen, dass ein Mismatch zwischen HPV-DNA Nachweis und p16-Immunhistochemie bei OPSCC-Patienten mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert ist im Vergleich zu einem konkordant positiven Ergebnis, was die Sinnhaftigkeit des für diese Arbeiten gewählten Ansatz einer dualen Detektionsmethode unterstreicht (MEHANNA et al., 2023). In der Validierungskohorte zeigte ein positiver HPV-Tumorstatus ebenfalls

eine signifikante Verbesserung der Prognose (siehe Abbildung 16A) und unterstreicht somit dessen Validität als wertvollen und in der klinischen Diagnostik etablierten prognostischen Biomarker bei Kopf-Hals Karzinomen. Im Rahmen der Analysen der prognostischen Aussagekraft des HPV-Tumorstatus erfolgte zudem die Analyse der Auswirkung des HPV-Status auf die Immunzellinfiltration innerhalb des Tumormikromilieus. In der TCGA-Kohorte zeigte sich im Einklang mit der aktuellen Literatur bei positivem HPV-Tumorstatus, unabhängig der genutzten Detektionsmethode, eine verstärkte, lymphozytäre Immunzellinfiltration (siehe Abbildung 9) (BHAT et al., 2021; ZENG et al., 2020). In der UKS-Kohorte konnte diese gesteigerte Immunzellinfiltration im Rahmen der CD4-CXCR5 Doppelfärbung sowohl intra- wie auch peritumoral, in der T-Helferzell-Teilfärbung (siehe Abbildung 20A) und in der CXCR5 Teilfärbung (siehe Abbildung 20B), sowie im Rahmen der CD20-CXCR5 Doppelfärbung sowohl intra- wie auch peritumoral in allen drei Teilfärbungen (siehe Abbildung 21) beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die hohe Validität des Humanen Papillomvirus als klinisch etablierten, prognostischen Biomarker bei Kopf- und Halstumoren, was sich in der in Tabelle 11 gezeigten für den HPV-Tumorstatus kontrollierenden Multivarianzanalyse mit logistischer Regression widerspiegelt. Da sich HPV-assoziierte Kopf-Hals-Tumore überwiegend im Bereich des Oropharynx befinden, der ohnehin durch reichlich vorhandenes Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe gekennzeichnet ist (u.a. Tonsilla lingualis, Tonsilla palatina, Seitenstränge), bleibt zu diskutieren und durch wissenschaftliche Arbeiten näher zu untersuchen, ob der gesteigerte Immuninfiltration bei diesen Tumoren und einem positiven HPV-Status einen kausaler Zusammenhang zugrunde liegt oder es sich letztlich nur um eine Koinzidenz handelt.

Die Tumorlokalisierung als weiteres zu analysierendes, klinisches Charakteristikum zeigte einen signifikanten Einfluss auf die lymphozytäre Immunzellinfiltration in der TCGA-Kohorte (siehe Abbildung 10A). Eine signifikant verstärkte Immunzellinfiltration fand sich hierbei vor allem in den Oropharynxkarzinomen. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da HPV positive Karzinome, die vor allem in der Oropharynxregion lokalisiert sind, allgemein eine verstärkte Anreicherung verschiedener Immunzellen aufweisen (MITO et al., 2021; SUBBARAYAN et al., 2019). Eine Antwort auf die Frage, wie HPV-positive Tumorzellen die Infiltration spezifischer Immunzellen in das Tumormikromilieu begünstigen können, kann u.a. aufgrund der unzureichenden Spezifität der in Studien verwendeten Antikörper und dem Fehlen eines klaren Konsortiums zur Definition der als Ziel zur Identifikation einer bestimmten Immunzelle dienenden Antigene noch nicht gegeben werden (LECHIEN et al., 2020). Sowohl die Raucherhistorie wie auch das Alter der Patienten konnten als möglicher Störfaktor zur Beurteilung der lymphozytären Immunzellinfiltration in dieser Arbeit ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 10 B+C). Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnten andere Studien wie *De La Iglesia et al.* und *Chung et al.* dennoch einen immunsuppressiven Effekt, ausgelöst durch die Suppression von IFN-Pathways und der damit verbundenen Reduktion der Immunzellinfiltration zytotoxischer T-Zellen in das TME und der Verminderung von PD-L1 bei aktiven Rauchern feststellen (CHUNG et al., 2019; DE LA IGLESIA et al., 2020). Gleichsam mit der Raucherhistorie konnten, im

Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, andere Studien einen altersabhängigen Unterschied in der Immunezellinfiltration folliculärer T-Helferzellen feststellen (SUN et al., 2021a). Eine potenzielle Erklärung der beim Alter beobachteten Unterschiede in der Immunezellinfiltration könnte die in dieser Arbeit betrachtete Gesamt-Lymphozytenpopulation im Gegensatz zur der von *Sun et al.* untersuchten Subpopulation der folliculären T-Helferzellen sein. Ebenso ist als möglicher Bias der vergleichsweise kleine Umfang der UKS-Kohorte und folglich der geringen Patientenzahl in den jeweiligen Alters- und Rauchergruppen zu berücksichtigen. Das UICC-Stadium, als weiteres in der UKS-Kohorte untersuchtes, klinisches Charakteristikum, zeigte signifikante, stadienabhängige Veränderungen der Prognose (siehe Abbildung 17), was die in bereits vielen Studien belegte, prognostische Relevanz der UICC-Einteilung unterstreicht (CHOW, 2020; WÜRDEMANN et al., 2017).

Trotz des durch eine Vielzahl an publizierten Studien belegten Einflusses des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels auf die Prognose von HNSCC-Patienten (BOCHEN et al., 2018; IZREIG et al., 2020), zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Effekt des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels auf die Prognose und die Immunezellinfiltration der Patienten in der UKS-Kohorte. Zumindest eine deutliche Tendenz zu einem verbessertem Gesamtüberleben der Patienten mit ausreichender Vitamin-D Versorgung konnte in der UKS-Kohorte beobachtet werden (siehe Abbildung 16B). Obwohl der Einfluss des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels auf die Prognose von HNSCC-Patienten bereits vielfach publiziert wurde, konnten einige Studien keine signifikanten Auswirkungen auf die Prognose von Kopf-Hals Tumorpatienten feststellen (AREM et al., 2011; MEYER et al., 2011). Zu beachten ist hierbei jedoch, dass insbesondere bei einer eingeschränkten Fallzahl die Datenanalyse zahlreiche, potenzielle Confounder in Form des HPV-Tumorstatus, des Nikotin- und Alkoholkonsums, sowie des geographischen Wohnorts und der somit verbundenen Dauer der Sonnenexposition aufweisen, die im Falle einer fehlenden Berücksichtigung durch Multivarianzanalysen zu einer relevanten Verzerrung der statistischen Datenanalyse und damit auch zur Verzerrung der Schlussfolgerungen der Studien führen können (BALENSIEFER, 2017). Der in dieser Arbeit untersuchte Zusammenhang zwischen dem 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegel und HPV-Status der Patienten zeigte eine signifikante Erhöhung des 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels bei positivem HPV-Tumorstatus (siehe Abbildung 22). Nur wenig Studien im Bereich der Kopf-Hals Immunonkologie untersuchten bisher diesen Zusammenhang. Nichtsdestotrotz konnte *Bochen et al.* ebenfalls eine Assoziation eines niedrigen Vitamin-D Serumspiegels mit einem negativen HPV-Tumorstatus nachweisen (BOCHEN et al., 2018). Im Gegensatz hierzu konnten gynäkologische Studien eine Assoziation eines niedrigen 25-OH-Vitamin-D-Serumspiegels mit einer Hochrisiko HPV Infektion nachweisen (CHU et al., 2021), was die tumorentitätenspezifische Rolle des Vitamin D-Serumspiegels unterstreicht und zu weiteren Untersuchungen motiviert.

Die Rolle von Analysen der zellulären Immunparameter des Tumormikromilieus im klinischen Alltag kann anhand der Einführung der gegen PD-1 gerichteten Immuncheckpoint-Inhibitoren Pembrolizumab



und Nivolumab in das therapeutische Management von Kopf-Hals Karzinomen verdeutlicht werden. Durch das bessere Ansprechen der PD-1 exprimierenden Patienten auf eine Immuncheckpoint-Inhibition zeigt sich die Bedeutsamkeit zuverlässiger Biomarker zur Stratifizierung der von einer Immuntherapie profitierenden Patienten (CROSTA et al., 2021). Die etablierte immunhistochemische Analyse von PD-L1 bedient sich hierbei diverser Scores in Form des Combined Positive Score (CPS) und Tumor Proportion Score (TPS) (EMANCIPATOR et al., 2021; GIUNCHI et al., 2020). Durch die Berücksichtigung der PD-1 Expression von Lymphozyten und Makrophagen betrachtet der CPS sowohl Tumorzellen wie auch Immunzellen, was trotz der hohen Validität beider Scores die in einigen Studien publizierte, höhere Sensitivität des CPS bezüglich der klinischen Ansprechraten erklären könnte (EMANCIPATOR et al., 2021). Die im Rahmen der Therapie mit Pembrolizumab beobachteten niedrigen Ansprechraten von ca. 15% regen zu weiteren Untersuchungen bezüglich möglicher immunologischer Crosstalks zwischen PD-1/PD-L1 und weiteren inhibitorischen molekularen Signalwegen an, deren Interaktion die suppressive zelluläre Immunität aufrechterhalten könnte. Die Aufklärung dieser Crosstalks stellt eine Möglichkeit zur Maximierung der Effektivität von anti PD-1 Therapien dar (QIAO et al., 2020). Weiterhin könnten Studien zur Verbesserung der Sensitivität der etablierten Detektionsmethoden sowie zur Optimierung der Auswahl zwischen den bestehenden Scores zukünftig den Gebrauch von Immuncheckpoint-Inhibitoren in früheren Behandlungsstadien begünstigen. Neben der Optimierung der etablierten PD-1 Detektionsmethoden und den etablierten Scoring-Systemen konnten *Hecht et al.* mit der CheckRad-CD8 Studie neue Ansätze zur Verbesserung der Ansprechraten von Immuntherapien liefern (HECHT et al., 2022). Hierbei wurden alle inkludierten Patienten zunächst mit dem PD-L1 Inhibitor Durvalumab und dem CTLA-4 Inhibitor Tremelimumab sowie einem Zyklus Cisplatin und Docetaxel behandelt und das Ansprechen auf diese Behandlung anhand einer Endoskopie mit Biopsie bewertet. Bei erhöhter Infiltration der intratumoralen CD8+ T-Zellen in der zweiten Biopsie im Vergleich zur Biopsie vor Studienbeginn und einem klinisch stabilen Krankheitsbild erfolgte eine Radioimmuntherapie mit dem PD-L1-Inhibitor Durvalumab und dem CTLA4-Inhibitor Tremelimumab gefolgt von einer Erhaltungstherapie mit Durvalumab. Trotz noch nicht beendeter Nachbeobachtung konnte bereits ein verbessertes 1- und 2- Jahres progression free und overall survival festgestellt werden. Weiterhin konnte ein signifikanter Benefit HPV-positiver Oropharynxkarzinome mit einem 2-Jahres OS von 94% verzeichnet werden (HECHT et al., 2022). Diese Ergebnisse veranschaulichen die Bedeutung einer adäquaten Patientenselektion sowie das Potenzial diverser Immunzellsubpopulationen als prognostische und prädiktive Marker zur Verbesserung der immuntherapeutischen Ansprechraten in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region und unterstreichen die klinische Relevanz der in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Untersuchungen.

Neben dem bereits beschriebenen, von *Hecht et al.* entwickeltem Ansatz einer auf der Detektion der zytotoxischen T-Zellen basierten Patientenselektion, gibt es noch weitere immuntherapeutische Strategien, deren Ansätze die in dieser Arbeit herausgearbeiteten, signifikant mit dem Überleben

korrelierenden Immunzellsubpopulationen einschließen (HECHT et al., 2022). Aufgrund der starken Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen in das Tumormikromilieu von HNSCCs und deren Suppression der antitumoralen Immunität sind die Tregs in den Fokus neuer immuntherapeutischer Ansätze gerückt (REVENKO et al., 2022). Der therapeutische Ansatz liegt hierbei in der Inhibition von FoxP3 durch Antisense Oligonukleotide, die eine Modulation der Treg-Aktivität und somit der antitumoralen Immunität bedingen. Der Antisense Oligonukleotid AZD8701 konnte einen dosisabhängigen Knockdown von FoxP3 in primären regulatorischen T-Zellen, eine Verringerung der Suppressionsfunktion und eine effektive Downregulation von Targets in humanisierten Mäusen bei klinisch relevanten Dosen zeigen. Außerdem steigerte er die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und erzeugte antitumorale Aktivität in syngenen Mausmodellen. Die Kombination von FoxP3-Antisense Oligonukleotiden mit einer Immun-Checkpoint-Blockade konnte weiterhin eine Verstärkung der antitumoralen Aktivität verzeichnen (REVENKO et al., 2022). Aufgrund dieser, in Mausmodellen beobachteten Wirkung wurde eine klinische Phase 1 Studie (NCT04504669) initiiert, in der u.a. HNSCC Patienten mit einer Monotherapie mit AZD8701 oder einer Kombination aus AZD8701 und Durvalumab therapiert werden. Erste Ergebnisse werden im Mai 2023 erwartet. Weitere immuntherapeutische Strategien beschäftigen sich mit der Einführung einer Chimeric antigen receptor (CAR) Technologie innerhalb der tumor-infiltrierenden Lymphozyten in HNSCCs (DAMASIO et al., 2022). Hierbei stehen den veränderten CAR T-Zellen diverse, durch HNSCC exprimierte Ziele wie CD276, EGFR, MICA, MICB, MAGE-A4, FAP, EPCAM, CD70 und B4GALNT1 zur Verfügung (PARK et al., 2018). Eine klinische Studie der Phase 1 mit T4 CAR T-Zellen zur Behandlung von Patienten mit HNSCC konnte bereits vielversprechende vorläufige klinische Daten generieren und zeigen, dass die intratumorale Injektion von T4 CAR T-Zellen sicher ist und keine Toxizität aufweist, und dass selbst bei schnell fortschreitenden Tumoren und fortgeschrittenem HNSCC bei 69% der Patienten eine Krankheitskontrolle durch die T4-Immuntherapie erzielt werden konnte (PAPA et al., 2018). Weitere Ergebnisse der Studie sollen im Dezember 2023 veröffentlicht werden.

Zusammenfassend konnten in dieser Promotionsarbeit die Gesamt-Lymphozytenpopulation, die zytotoxischen T-Zellen und die folliculären T-Helferzellen in zwei unterschiedlichen Patientenkohorten und mit unterschiedlichen Detektionsmethoden als die prognostisch relevantesten Subpopulationen der tumor-infiltrierenden Leukozyten von Kopf-Hals Karzinomen identifiziert werden und stellen daher vielversprechende Ziele zukünftiger immuntherapeutischen Strategien dar. Der prognostische Einfluss des immunologischen Tumormikromilieus ist, wie in dieser Arbeit gezeigt, signifikant von der Patientenkohorte und der gewählten Detektionsmethoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Immunparametern abhängig, wobei diverse Einflussfaktoren auf die prognostische Eigenschaft vieler Immunzellsubpopulationen innerhalb des TME noch nicht vollständig verstanden sind. In der Tat ist die Immunantwort ein sehr dynamischer Prozess, der die Bewertung aller Immunzellsubpopulationen

erfordert, um ihr Zusammenspiel und die Folgen für die Prognose des Patienten zu verstehen. Die Tatsache, dass Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals Region eines der dynamischsten Gebiete der immunonkologischen Forschung darstellen, was sich in zahlreichen laufenden klinischen Studien zur Verbesserung und Entwicklung neuer immuntherapeutischer Ansätze, sowie in dem sich ständig weiterentwickelndem Wissen über die biologischen Mechanismen der Interaktion zwischen Tumor und dem Immunsystem zeigt, wird weiter Aufschluss über dieses faszinierende Gebiet der Krebsforschung geben. Aufgrund der niedrigen Ansprechraten vieler Patienten auf eine Immuncheckpoint-Monotherapie erfordert es weitere Grundlagen- wie auch klinische Forschung, um zu beurteilen, ob Immuncheckpoint-Inhibitoren zukünftig einen Paradigmenwechsels im Behandlungsspektrum von Kopf-Hals Karzinomen herbeiführen können. Vor diesem Hintergrund konnte diese Arbeit das enorme Potential verschiedener Immunparameter des Tumormikromilieus von Kopf-Hals Karzinomen als verlässliche und valide prognostische Biomarker, sowie die Möglichkeit dieser Immunzellsubpopulationen als zukünftige therapeutische Ziele aufzeigen. In Zukunft könnten weitere Studien, die einen tieferen Einblick und ein verbessertes Verständnis des komplexen immunologischen Tumormikromilieus erlauben, verbesserte prognostische Vorhersagen, sowie effektivere und präzisere immunonkologische Therapien von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region ermöglichen.

## 6 Quellenangaben

1. Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-793
2. Agarbati S, Mascitti M, Paolucci E, Togni L, Santarelli A, Rubini C, Fazioli F (2021) Prognostic Relevance of Macrophage Phenotypes in High-grade Oral Tongue Squamous Cell Carcinomas. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 29:359-365
3. Al-Qahtani D, Anil S, Rajendran R (2011) Tumour infiltrating CD25+ FoxP3+ regulatory T cells (Tregs) relate to tumour grade and stromal inflammation in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine* 40:636-642
4. Alberts B JA, Lewis J, et al. (2014) *Molecular Biology of the Cell*. 6th edition (New York, Garland Science;).
5. Almangush A, Leivo I, Mäkitie AA (2021) Biomarkers for Immunotherapy of Oral Squamous Cell Carcinoma: Current Status and Challenges. *Front Oncol* 11:616629
6. Almangush A, De Keukeleire S, Rottey S, Ferdinande L, Vermassen T, Leivo I, Mäkitie AA (2022) Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Cancer: Ready for Prime Time? *Cancers (Basel)* 14
7. Alnuaimi AD, Wiesenfeld D, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, McCullough MJ (2015) Oral *Candida* colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: a matched case-control study. *Oral Oncol* 51:139-145
8. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, Meyer L, Gress DM, Byrd DR, Winchester DP (2017) The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 67:93-99
9. Amtha R, Razak IA, Basuki B, Roeslan BO, Gautama W, Puwanto DJ, Ghani WM, Zain RB (2014) Tobacco (kretek) smoking, betel quid chewing and risk of oral cancer in a selected Jakarta population. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:8673-8678
10. Anderson NM, Simon MC (2020) The tumor microenvironment. *Curr Biol* 30:R921-r925
11. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363:24-35
12. Arem H, Weinstein SJ, Horst RL, Virtamo J, Yu K, Albanes D, Abnet CC (2011) Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of oropharynx and larynx cancers in Finnish men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20:1178-1184
13. Arnold CE, Whyte CS, Gordon P, Barker RN, Rees AJ, Wilson HM (2014) A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology* 141:96-110
14. Augustin JG, Lepine C, Morini A, Brunet A, Veyer D, Brochard C, Mirghani H, Péré H, Badoual C (2020) HPV Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: What Is the Issue? *Front Oncol* 10:1751
15. Balensiefer B (2017) Einfluss von Vitamin D auf die tumorspezifische Immunabwehr bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (Homburg/Saar, Universität des Saarlandes).
16. Bart VMT, Pickering RJ, Taylor PR, Ipseiz N (2021) Macrophage reprogramming for therapy. *Immunology* 163:128-144
17. Bauman JE, Cohen E, Ferris RL, Adelstein DJ, Brizel DM, Ridge JA, O'Sullivan B, Burtneess BA, Butterfield LH, Carson WE, Disis ML, Fox BA, Gajewski TF, Gillison ML, Hodge JW, Le QT, Raben D, Strome SE, Lynn J, Malik S (2017) Immunotherapy of head and neck cancer: Emerging clinical trials from a National Cancer Institute Head and Neck Cancer Steering Committee Planning Meeting. *Cancer* 123:1259-1271

18. Baumjohann D, Brossart P (2021) T follicular helper cells: linking cancer immunotherapy and immune-related adverse events. *J Immunother Cancer* 9
19. Bauml JM, Aggarwal C, Cohen RB (2019) Immunotherapy for head and neck cancer: where are we now and where are we going? *Ann Transl Med* 7:S75
20. Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH (2005) Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res* 11:5694-5699
21. Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M (1989) The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 63:4317-4324
22. Bhat AA, Yousuf P, Wani NA, Rizwan A, Chauhan SS, Siddiqi MA, Bedognetti D, El-Rifai W, Frenneaux MP, Batra SK, Haris M, Macha MA (2021) Tumor microenvironment: an evil nexus promoting aggressive head and neck squamous cell carcinoma and avenue for targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6:12
23. Bienkowska KJ, Hanley CJ, Thomas GJ (2021) Cancer-Associated Fibroblasts in Oral Cancer: A Current Perspective on Function and Potential for Therapeutic Targeting. *Frontiers in Oral Health* 2
24. Bisheshar SK, van der Kamp MF, de Ruiter EJ, Ruiter LN, van der Vegt B, Breimer GE, Willems SM (2022) The prognostic role of tumor associated macrophages in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology* 135:106227
25. Bochen F, Balensiefer B, Körner S, Bittenbring JT, Neumann F, Koch A, Bumm K, Marx A, Wemmert S, Papaspyrou G, Zuschlag D, Kühn JP, Al Kadah B, Schick B, Linxweiler M (2018) Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients - prevalence, prognostic value and impact on immune function. *Oncoimmunology* 7:e1476817
26. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Yousoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354:567-578
27. Borsetto D, Tomasoni M, Payne K, Polesel J, Deganello A, Bossi P, Tysome JR, Masterson L, Tirelli G, Tofanelli M, Boscolo-Rizzo P (2021) Prognostic Significance of CD4+ and CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Cancers (Basel)* 13
28. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394-424
29. Bryant VL, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL, Corcoran LM, de Waal Malefyt R, Tangye SG (2007) Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J Immunol* 179:8180-8190
30. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, Jr., Psyrrri A, Basté N, Neupane P, Bratland Å, Fuereder T, Hughes BGM, Mesía R, Ngamphaiboon N, Rordorf T, Wan Ishak WZ, Hong RL, González Mendoza R, Roy A, Zhang Y, Gumuscu B, Cheng JD, Jin F, Rischin D (2019) Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 394:1915-1928
31. Cai H, Zhang Y, Wang J, Gu J (2021) Defects in Macrophage Reprogramming in Cancer Therapy: The Negative Impact of PD-L1/PD-1. *Frontiers in Immunology* 12
32. Campbell JD, Yau C, Bowlby R, Liu Y, Brennan K, Fan H, Taylor AM, Wang C, Walter V, Akbani R, Byers LA, Creighton CJ, Coarfa C, Shih J, Cherniack AD, Gevaert O, Prunello M, Shen H, Anur P, Chen J, Cheng H, Hayes DN, Bullman S, Pedomallu CS, Ojesina AI, Sadeghi S, Mungall KL, Robertson AG, Benz C, Schultz A, Kanchi RS, Gay CM, Hegde A, Diao L, Wang J, Ma W, Sumazin P, Chiu HS, Chen TW, Gunaratne P, Donehower L, Rader JS, Zuna R, Al-Ahmadie H, Lazar AJ, Flores ER, Tsai KY, Zhou

- JH, Rustgi AK, Drill E, Shen R, Wong CK, Stuart JM, Laird PW, Hoadley KA, Weinstein JN, Peto M, Pickering CR, Chen Z, Van Waes C (2018) Genomic, Pathway Network, and Immunologic Features Distinguishing Squamous Carcinomas. *Cell Rep* 23:194-212.e196
33. Camuzi D, Simão TA, Dias F, Ribeiro Pinto LF, Soares-Lima SC (2021) Head and Neck Cancers Are Not Alike When Tarred with the Same Brush: An Epigenetic Perspective from the Cancerization Field to Prognosis. *Cancers (Basel)* 13
  34. Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S, Clavero O, Alòs L, Biegner T, Szafarowski T, Alejo M, Holzinger D, Cadena E, Claros E, Hall G, Laco J, Poljak M, Benevolo M, Kasamatsu E, Mehanna H, Ndiaye C, Guimerà N, Lloveras B, León X, Ruiz-Cabezas JC, Alvarado-Cabrero I, Kang CS, Oh JK, Garcia-Rojo M, Ilijazovic E, Ajayi OF, Duarte F, Nessa A, Tinoco L, Duran-Padilla MA, Pirog EC, Viarheichyk H, Morales H, Costes V, Félix A, Germar MJ, Mena M, Ruacan A, Jain A, Mehrotra R, Goodman MT, Lombardi LE, Ferrera A, Malami S, Albanesi EI, Dabed P, Molina C, López-Revilla R, Mandys V, González ME, Velasco J, Bravo IG, Quint W, Pawlita M, Muñoz N, de Sanjosé S, Xavier Bosch F (2016) HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst* 108:djv403
  35. Chamoli A, Gosavi AS, Shirwadkar UP, Wangdale KV, Behera SK, Kurrey NK, Kalia K, Mandoli A (2021) Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. *Oral Oncology* 121:105451
  36. Chang H, Hong HJ, Kim Y (2019) Prognostic value of trafficking of regulatory T cells to tumors in head and neck cancer patients. *Journal of Global Oncology* 5:104-104
  37. Chen SMY, Krinsky AL, Woolaver RA, Wang X, Chen Z, Wang JH (2020) Tumor immune microenvironment in head and neck cancers. *Mol Carcinog* 59:766-774
  38. Chen W-Y, Wu C-T, Wang C-W, Lan K-H, Liang HK, Huang B-S, Chang Y-L, Kuo S-H, Cheng A-L (2018) Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with operable tongue cancer. *Radiation Oncology* 13:157
  39. Chow LQM (2020) Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 382:60-72
  40. Chu T-W, Jhao J-Y, Lin T-J, Lin T-W, Wang C-L, Chang H-S, Liu L-C, Chang C-C (2021) Vitamin D in gynecological diseases. *Journal of the Chinese Medical Association* 84:1054-1059
  41. Chung CH, de la Iglesia JV, Wang X, Song F, Chaudhary R, Masannat J, Conejo-Garcia J, Hernandez-Prera J, Slebos R (2019) 1908P - Tobacco smoking is associated with the immune suppressive microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Annals of Oncology* 30:v772
  42. Cillo AR, Kürten CHL, Tabib T, Qi Z, Onkar S, Wang T, Liu A, Duvvuri U, Kim S, Soose RJ, Oesterreich S, Chen W, Lafyatis R, Bruno TC, Ferris RL, Vignali DAA (2020) Immune Landscape of Viral- and Carcinogen-Driven Head and Neck Cancer. *Immunity* 52:183-199.e189
  43. Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn MJ, Soria A, Machiels JP, Mach N, Mehra R, Burtness B, Zhang P, Cheng J, Swaby RF, Harrington KJ (2019) Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 393:156-167
  44. Concu R, Cordeiro M (2018) Cetuximab and the Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Curr Top Med Chem* 18:192-198
  45. Cooper LA, Demicco EG, Saltz JH, Powell RT, Rao A, Lazar AJ (2018) PanCancer insights from The Cancer Genome Atlas: the pathologist's perspective. *J Pathol* 244:512-524
  46. Costa NL, Valadares MC, Souza PP, Mendonça EF, Oliveira JC, Silva TA, Batista AC (2013) Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 49:216-223
  47. Crosta S, Boldorini R, Bono F, Brambilla V, Dainese E, Fusco N, Gianatti A, L'Imperio V, Morbini P, Pagni F (2021) PD-L1 Testing and Squamous Cell Carcinoma of the Head

- and Neck: A Multicenter Study on the Diagnostic Reproducibility of Different Protocols. *Cancers (Basel)* 13
48. Crotty S (2011) Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29:621-663
  49. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML (2007) Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356:1944-1956
  50. Damasio MPS, Nascimento CS, Andrade LM, de Oliveira VL, Calzavara-Silva CE (2022) The role of T-cells in head and neck squamous cell carcinoma: From immunity to immunotherapy. *Frontiers in Oncology* 12
  51. Davis RJ, Van Waes C, Allen CT (2016) Overcoming barriers to effective immunotherapy: MDSCs, TAMs, and Tregs as mediators of the immunosuppressive microenvironment in head and neck cancer. *Oral Oncol* 58:59-70
  52. De Azevedo J, Mourtada J, Bour C, Devignot V, Schultz P, Borel C, Pencreach E, Mellitzer G, Gaiddon C, Jung AC (2022) The EXTREME Regimen Associating Cetuximab and Cisplatin Favors Head and Neck Cancer Cell Death and Immunogenicity with the Induction of an Anti-Cancer Immune Response. *Cells* 11
  53. de Cássia Braga Ribeiro K, Kowalski LP, Latorre Mdo R (2003) Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129:219-228
  54. de la Iglesia JV, Slebos RJC, Martin-Gomez L, Wang X, Teer JK, Tan AC, Gerke TA, Aden-Buie G, van Veen T, Masannat J, Chaudhary R, Song F, Fournier M, Siegel EM, Schabath MB, Wadsworth JT, Caudell J, Harrison L, Wenig BM, Conejo-Garcia J, Hernandez-Prera JC, Chung CH (2020) Effects of Tobacco Smoking on the Tumor Immune Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 26:1474-1485
  55. De Meulenaere A, Vermassen T, Aspeslagh S, Vandecasteele K, Rottey S, Ferdinande L (2017) TILs in head and neck cancer: ready for clinical implementation and why (not)? *Head and neck pathology* 11:354-363
  56. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76 ( Pt 4):1057-1062
  57. de Ruiter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM (2017) The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology* 6:e1356148
  58. Downs-Canner SM, Meier J, Vincent BG, Serody JS (2022) B Cell Function in the Tumor Microenvironment. *Annual Review of Immunology* 40:169-193
  59. Du E, Mazul AL, Farquhar D, Brennan P, Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, Weissler MC, Hayes DN, Olshan AF, Zevallos JP (2019) Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *Laryngoscope* 129:2506-2513
  60. Economopoulou P, Kotsantis I, Psyrris A (2020) Tumor Microenvironment and Immunotherapy Response in Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel)* 12
  61. El-Naggar AK, Chan JK, Grandis JR (2017) WHO classification of head and neck tumours).
  62. Elmusrati A, Wang J, Wang C-Y (2021) Tumor microenvironment and immune evasion in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral Science* 13:24
  63. Emancipator K, Huang L, Aurora-Garg D, Bal T, Cohen EEW, Harrington K, Soulières D, Le Tourneau C, Licitra L, Burtneess B, Swaby R (2021) Comparing programmed death ligand 1 scores for predicting pembrolizumab efficacy in head and neck cancer. *Mod Pathol* 34:532-541
  64. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML (2008) Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100:261-269
  65. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-2917

66. Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Monga M, Lynch M, Geese WJ, Kopit J, Shaw JW, Gillison ML (2016) Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 375:1856-1867
67. Gillison ML, Trotti AM, Harris J, Eisbruch A, Harari PM, Adelstein DJ, Jordan RCK, Zhao W, Sturgis EM, Burtness B, Ridge JA, Ringash J, Galvin J, Yao M, Koyfman SA, Blakaj DM, Razaq MA, Colevas AD, Beitler JJ, Jones CU, Dunlap NE, Seaward SA, Spencer S, Galloway TJ, Phan J, Dignam JJ, Le QT (2019) Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet* 393:40-50
68. Giunchi F, Gevaert T, Scarpelli M, Fiorentino M (2020) Status of Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) by Immunohistochemistry and Scoring Algorithms. *Curr Drug Targets* 21:1286-1292
69. Goel B, Tiwari AK, Pandey RK, Singh AP, Kumar S, Sinha A, Jain SK, Khattri A (2022) Therapeutic approaches for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma- An update on clinical trials. *Transl Oncol* 21:101426
70. Gutiérrez-Melo N, Baumjohann D T follicular helper cells in cancer. *Trends in Cancer*
71. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674
72. Hecht M, Eckstein M, Rutzner S, von der Grün J, Illmer T, Klautke G, Laban S, Hautmann MG, Brunner TB, Tamaskovics B, Hinke A, Zhou JG, Frey B, Donaubaue AJ, Becker I, Semrau S, Hartmann A, Balermipas P, Budach W, Gaip US, Iro H, Gostian AO, Fietkau R (2022) Induction chemoimmunotherapy followed by CD8+ immune cell-based patient selection for chemotherapy-free radioimmunotherapy in locally advanced head and neck cancer. *J Immunother Cancer* 10
73. Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, Yizhak K, Sade-Feldman M, Blando J, Han G, Gopalakrishnan V, Xi Y, Zhao H, Amaria RN, Tawbi HA, Cogdill AP, Liu W, LeBleu VS, Kugeratski FG, Patel S, Davies MA, Hwu P, Lee JE, Gershenwald JE, Lucci A, Arora R, Woodman S, Keung EZ, Gaudreau P-O, Reuben A, Spencer CN, Burton EM, Haydu LE, Lazar AJ, Zapassodi R, Hudgens CW, Ledesma DA, Ong S, Bailey M, Warren S, Rao D, Krijgsman O, Rozeman EA, Peeper D, Blank CU, Schumacher TN, Butterfield LH, Zelazowska MA, McBride KM, Kalluri R, Allison J, Petitprez F, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Hacohen N, Rezvani K, Sharma P, Tetzlaff MT, Wang L, Wargo JA (2020) B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature* 577:549-555
74. Henneken M, Dörner T, Burmester GR, Berek C (2005) Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 7:R1001-1013
75. Hinshaw DC, Shevde LA (2019) The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research* 79:4557-4566
76. Hof H, Dörries R (2017) *Medizinische Mikrobiologie : 540 Abbildungen*, 6., unveränderte Auflage edn (Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG).
77. Izreig S, Hajek M, Edwards HA, Mehra S, Sasaki C, Judson BL, Rahmati RW (2020) The role of vitamin D in head and neck cancer. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 5:1079-1088
78. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M (2001) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition (New York: Garland Science).
79. Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR (2020) Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 6:92
80. Kamerkar S, Leng C, Burenkova O, Jang SC, McCoy C, Zhang K, Dooley K, Kasera S, Zi T, Sisó S, Dahlberg W, Sia CL, Patel S, Schmidt K, Economides K, Soos T, Burzyn D, Sathyanarayanan S (2022) Exosome-mediated genetic reprogramming of tumor-associated macrophages by exoASO-STAT6 leads to potent monotherapy antitumor activity. *Sci Adv* 8:eabj7002



81. Kang SH, Oh SY, Lee HJ, Kwon TG, Kim JW, Lee ST, Choi SY, Hong SH (2021) Cancer-Associated Fibroblast Subgroups Showing Differential Promoting Effect on HNSCC Progression. *Cancers (Basel)* 13
82. Kazemi MH, Sadri M, Najafi A, Rahimi A, Baghernejadan Z, Khorramdelazad H, Falak R (2022) Tumor-infiltrating lymphocytes for treatment of solid tumors: It takes two to tango? *Frontiers in Immunology* 13
83. Kirman JR, Quinn KM, Seder RA (2019) Immunological memory. *Immunol Cell Biol* 97:615-616
84. Kläsener K, Jellusova J, Andrieux G, Salzer U, Böhler C, Steiner SN, Albinus JB, Cavallari M, Süß B, Voll RE, Boerries M, Wollscheid B, Reth M (2021) CD20 as a gatekeeper of the resting state of human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118:e2021342118
85. Kozakiewicz P, Grzybowska-Szatkowska L (2018) Application of molecular targeted therapies in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 15:7497-7505
86. Kühn JP, Schmid W, Körner S, Bochen F, Wemmert S, Rimbach H, Smola S, Radosa JC, Wagner M, Morris LGT, Bozzato V, Bozzato A, Schick B, Linxweiler M (2021) HPV Status as Prognostic Biomarker in Head and Neck Cancer-Which Method Fits the Best for Outcome Prediction? *Cancers (Basel)* 13
87. Kumar AT, Knops A, Swendseid B, Martinez-Outschoom U, Harshyne L, Philp N, Rodeck U, Luginbuhl A, Cognetti D, Johnson J, Curry J (2019) Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophage Content in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Front Oncol* 9:656
88. Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30:16-34
89. Kürten CHL, Kulkarni A, Cillo AR, Santos PM, Roble AK, Onkar S, Reeder C, Lang S, Chen X, Duvvuri U, Kim S, Liu A, Tabib T, Lafyatis R, Feng J, Gao SJ, Bruno TC, Vignali DAA, Lu X, Bao R, Vujanovic L, Ferris RL (2021) Investigating immune and non-immune cell interactions in head and neck tumors by single-cell RNA sequencing. *Nat Commun* 12:7338
90. Laurent C, Fazilleau N, Brousset P (2010) A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers. *Haematologica* 95:356-358
91. Lechien JR, Descamps G, Seminerio I, Furguele S, Dequanter D, Mouawad F, Badoual C, Journe F, Saussez S (2020) HPV Involvement in the Tumor Microenvironment and Immune Treatment in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)* 12
92. Lechner A, Schlößler HA, Thelen M, Wennhold K, Rothschild SI, Gilles R, Quaas A, Siefer OG, Huebbers CU, Cukuroglu E, Göke J, Hillmer A, Gathof B, Meyer MF, Klusmann JP, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S, Beutner D, von Bergwelt-Baildon M (2019) Tumor-associated B cells and humoral immune response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 8:1535293
93. Lee Y-G, Kang EJ, Keam B, Choi J-H, Kim J-S, Park KU, Lee KE, Kwon JH, Lee K-W, Kim MK, Ahn HK, Shin SH, Kim HR, Kim S-B, Yun HJ (2020) Treatment strategy and outcomes in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: a nationwide retrospective cohort study (KCSG HN13–01). *BMC Cancer* 20:813
94. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH (2018) The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* 18:269-282
95. Lequerica-Fernández P, Suárez-Canto J, Rodriguez-Santamarta T, Rodrigo JP, Suárez-Sánchez FJ, Blanco-Lorenzo V, Domínguez-Iglesias F, García-Pedrero JM, de Vicente JC (2021) Prognostic Relevance of CD4(+), CD8(+) and FOXP3(+) TILs in Oral Squamous Cell Carcinoma and Correlations with PD-L1 and Cancer Stem Cell Markers. *Biomedicines* 9
96. Lewis CE, Pollard JW (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66:605-612
97. Lewis JS, Jr., Beadle B, Bishop JA, Chernock RD, Colasacco C, Lacchetti C, Moncur JT, Rocco JW, Schwartz MR, Seethala RR, Thomas NE, Westra WH, Faquin WC

- (2018) Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 142:559-597
98. Liang YJ, Liu HC, Su YX, Zhang TH, Chu M, Liang LZ, Liao GQ (2011) Foxp3 expressed by tongue squamous cell carcinoma cells correlates with clinicopathologic features and overall survival in tongue squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 47:566-570
  99. Lim KP, Chun NA, Ismail SM, Abraham MT, Yusoff MN, Zain RB, Ngeow WC, Ponniah S, Cheong SC (2014) CD4+CD25hiCD127low regulatory T cells are increased in oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS One* 9:e103975
  100. Long Q, Huang C, Meng Q, Peng J, Yao F, Du D, Wang X, Zhu W, Shi D, Xu X, Qi X, Deng W, Chen M, Li Y, Yang A (2021) TNF Patterns and Tumor Microenvironment Characterization in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Immunol* 12:754818
  101. Lopes-Carvalho T, Kearney JF (2004) Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev* 197:192-205
  102. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2015) Taschenlehrbuch Histologie, 5., vollständig überarbeitete Auflage edn (Stuttgart ; New York, Georg Thieme Verlag).
  103. Machiels JP, René Leemans C, Golusinski W, Grau C, Licitra L, Gregoire V (2020) Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 31:1462-1475
  104. Maggioni D, Pignataro L, Garavello W (2017) T-helper and T-regulatory cells modulation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Immunology* 6:e1325066
  105. Magnes T, Wagner S, Kiem D, Weiss L, Rinnerthaler G, Greil R, Melchardt T (2021) Prognostic and Predictive Factors in Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* 22
  106. Mahdavifar N, Towhidi F, Makhsosi BR, Pakzad R, Moini A, Ahmadi A, Lotfi S, Salehiniya H (2016) Incidence and Mortality of Nasopharynx Cancer and Its Relationship With Human Development Index in the World in 2012. *World J Oncol* 7:109-118
  107. Mandal R, Şenbabaoğlu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, Lee KW, Ganly I, Hakimi AA, Chan TA, Morris LG (2016) The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight* 1:e89829
  108. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA (2010) HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 11:781-789
  109. McDermott JD, Bowles DW (2019) Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies. *Current Treatment Options in Oncology* 20:43
  110. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, Roberts S (2013) Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* 35:747-755
  111. Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T, Dalby M, Mistry P, Sen M, O'Toole L, Al Booz H, Dyker K, Moleron R, Whitaker S, Brennan S, Cook A, Griffin M, Aynsley E, Rolles M, De Winton E, Chan A, Srinivasan D, Nixon I, Grumett J, Leemans CR, Buter J, Henderson J, Harrington K, McConkey C, Gray A, Dunn J (2019) Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 393:51-60
  112. Mehanna H, Taberna M, von Buchwald C, Tous S, Brooks J, Mena M, Morey F, Grønhøj C, Rasmussen JH, Garset-Zamani M, Bruni L, Batis N, Brakenhoff RH, Leemans CR, Baatenburg de Jong RJ, Klussmann JP, Wuerdemann N, Wagner S, Dalianis T, Marklund L, Mirghani H, Schache A, James JA, Huang SH, O'Sullivan B, Nankivell P, Broglie MA, Hoffmann M, Quabius ES, Alemany L (2023) Prognostic implications of p16 and HPV discordance in oropharyngeal cancer (HNCIG-EPIC-

- OPC): a multicentre, multinational, individual patient data analysis. *Lancet Oncol* 24:239-251
113. Mei Z, Huang J, Qiao B, Lam AK-y (2020) Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral Science* 12:16
  114. Meyer F, Liu G, Douville P, Samson E, Xu W, Adjei A, Bairati I (2011) Dietary vitamin D intake and serum 25-hydroxyvitamin D level in relation to disease outcomes in head and neck cancer patients. *Int J Cancer* 128:1741-1746
  115. Mito I, Takahashi H, Kawabata-Iwakawa R, Ida S, Tada H, Chikamatsu K (2021) Comprehensive analysis of immune cell enrichment in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma. *Scientific Reports* 11:16134
  116. Mumberg D, Monach PA, Wanderling S, Philip M, Toledano AY, Schreiber RD, Schreiber H (1999) CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8633-8638
  117. Muraro E, Fanetti G, Lupato V, Giacomarra V, Steffan A, Gobitti C, Vaccher E, Franchin G (2021) Cetuximab in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: Biological mechanisms involved in efficacy, toxicity and resistance. *Crit Rev Oncol Hematol* 164:103424
  118. Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, Salehi E, Nashtaei MS, Khanlarkhani N, Khezri Z, Majidpoor J, Abouzaripour M, Habibi M, Kashani IR, Mortezaee K (2019) Macrophage polarity in cancer: A review. *J Cell Biochem* 120:2756-2765
  119. Näsman A, Romanitan M, Nordfors C, Grün N, Johansson H, Hammarstedt L, Marklund L, Munck-Wikland E, Dalianis T, Ramqvist T (2012) Tumor infiltrating CD8+ and Foxp3+ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer. *PLoS One* 7:e38711
  120. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, Hoang CD, Diehn M, Alizadeh AA (2015) Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* 12:453-457
  121. Niogret J, Berger H, Rebe C, Mary R, Ballot E, Truntzer C, Thibaudin M, Derangère V, Hibos C, Hampe L, Rageot D, Accogli T, Joubert P, Routy B, Harker J, Vegran F, Ghiringhelli F, Chalmin F (2021) Follicular helper-T cells restore CD8(+)-dependent antitumor immunity and anti-PD-L1/PD-1 efficacy. *J Immunother Cancer* 9
  122. Nishikawa H, Sakaguchi S (2014) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Current opinion in immunology* 27:1-7
  123. Papa S, Adami A, Metoudi M, Achkova D, Schalkwyk Mv, Pereira AP, Bosshard-Carter L, Whilding L, Stegen Svd, Davies D, Farzaneh F, Urbano TG, Jeannon J-P, Spicer JF, Maher J (2018) A phase I trial of T4 CAR T-cell immunotherapy in head and neck squamous cancer (HNSCC). *Journal of Clinical Oncology* 36:3046-3046
  124. Park YP, Jin L, Bennett KB, Wang D, Fredenburg KM, Tseng JE, Chang LJ, Huang J, Chan EKL (2018) CD70 as a target for chimeric antigen receptor T cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 78:145-150
  125. Parkin J, Cohen B (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357:1777-1789
  126. Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, Anzai Y, Brizel DM, Bruce JY, Busse PM, Caudell JJ, Cmelak AJ, Colevas AD, Eisele DW, Fenton M, Foote RL, Galloway T, Gillison ML, Haddad RI, Hicks WL, Hitchcock YJ, Jimeno A, Leizman D, Maghami E, Mell LK, Mittal BB, Pinto HA, Ridge JA, Rocco JW, Rodriguez CP, Shah JP, Weber RS, Weinstein G, Witek M, Worden F, Yom SS, Zhen W, Burns JL, Darlow SD (2020) Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 18:873-898
  127. Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, Sztalmachova M, Adam V, Kizek R, Masarik M (2014) Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncol* 50:168-177
  128. Powell SF, Vu L, Spanos WC, Pyeon D (2021) The Key Differences between Human Papillomavirus-Positive and -Negative Head and Neck Cancers: Biological and Clinical Implications. *Cancers (Basel)* 13

129. Qiao XW, Jiang J, Pang X, Huang MC, Tang YJ, Liang XH, Tang YL (2020) The Evolving Landscape of PD-1/PD-L1 Pathway in Head and Neck Cancer. *Front Immunol* 11:1721
130. Qin Y, Zheng X, Gao W, Wang B, Wu Y (2021) Tumor microenvironment and immune-related therapies of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Ther Oncolytics* 20:342-351
131. Ramesh A, Kumar S, Nandi D, Kulkarni A (2019) CSF1R- and SHP2-Inhibitor-Loaded Nanoparticles Enhance Cytotoxic Activity and Phagocytosis in Tumor-Associated Macrophages. *Adv Mater* 31:e1904364
132. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I (2021) Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer* 124:359-367
133. Remmele W, Stegner HE (1987) [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 8:138-140
134. Revenko A, Carnevalli LS, Sinclair C, Johnson B, Peter A, Taylor M, Hettrick L, Chapman M, Klein S, Solanki A, Gattis D, Watt A, Hughes AM, Magiera L, Kar G, Ireland L, Mele DA, Sah V, Singh M, Walton J, Mairesse M, King M, Edbrooke M, Lyne P, Barry ST, Fawell S, Goldberg FW, MacLeod AR (2022) Direct targeting of FOXP3 in Tregs with AZD8701, a novel antisense oligonucleotide to relieve immunosuppression in cancer. *J Immunother Cancer* 10
135. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N (2015) Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* 160:48-61
136. Ruffin AT, Cillo AR, Tabib T, Liu A, Onkar S, Kunning SR, Lampenfeld C, Atiya HI, Abecassis I, Kürten CHL, Qi Z, Soose R, Duvvuri U, Kim S, Oesterrich S, Lafyatis R, Coffman LG, Ferris RL, Vignali DAA, Bruno TC (2021) B cell signatures and tertiary lymphoid structures contribute to outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Communications* 12:3349
137. Ruprecht K, Ferreira H, Flockerzi A, Wahl S, Sauter M, Mayer J, Mueller-Lantzsch N (2008) Human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) RNA transcripts are selectively packaged into retroviral particles produced by the human germ cell tumor line Tera-1 and originate mainly from a provirus on chromosome 22q11.21. *J Virol* 82:10008-10016
138. Sabatini ME, Chiocca S (2020) Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *British Journal of Cancer* 122:306-314
139. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, Hom J, Lee FE-H (2019) Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Frontiers in Immunology* 10
140. Sarvaria A, Madrigal JA, Saudemont A (2017) B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 14:662-674
141. Schaafsma E, Jiang C, Cheng C (2021) B cell infiltration is highly associated with prognosis and an immune-infiltrated tumor microenvironment in neuroblastoma. *J Cancer Metastasis Treat* 7
142. Scott EM, Jacobus EJ, Lyons B, Frost S, Freedman JD, Dyer A, Khaliq H, Taverner WK, Carr A, Champion BR, Fisher KD, Seymour LW, Duffy MR (2019) Bi- and tri-valent T cell engagers deplete tumour-associated macrophages in cancer patient samples. *J Immunother Cancer* 7:320
143. Seiwert TY, Zuo Z, Keck MK, Khattri A, Pedamallu CS, Stricker T, Brown C, Pugh TJ, Stojanov P, Cho J, Lawrence MS, Getz G, Brägelmann J, DeBoer R, Weichselbaum RR, Langerman A, Portugal L, Blair E, Stenson K, Lingen MW, Cohen EE, Vokes EE, White KP, Hammerman PS (2015) Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 21:632-641
144. Seminerio I, Descamps G, Dupont S, de Marrez L, Laigle JA, Lechien JR, Kindt N, Journe F, Saussez S (2019) Infiltration of FoxP3+ Regulatory T Cells is a Strong and Independent Prognostic Factor in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* 11

145. Shibata H, Saito S, Uppaluri R (2021) Immunotherapy for Head and Neck Cancer: A Paradigm Shift From Induction Chemotherapy to Neoadjuvant Immunotherapy. *Front Oncol* 11:727433
146. Shimizu S, Hiratsuka H, Koike K, Tsuchihashi K, Sonoda T, Ogi K, Miyakawa A, Kobayashi J, Kaneko T, Igarashi T, Hasegawa T, Miyazaki A (2019) Tumor-infiltrating CD8(+) T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med* 8:80-93
147. Singh D, Ganesan A, Panwar B, Eschweiler S, Hanley C, Madrigal A, Ramírez-Suástegui C, Wang A, Clarke J, Wood O, Garrido-Martin E, Chee S, Seumois G, Belanger S, Alzetani A, Woo E, Friedmann P, Crotty S, Thomas G, Sanchez-Elsner T, Ay F, Ottensmeier C, Vijayanand P (2020) CD4<sup>+</sup> follicular helper-like T cells are key players in anti-tumor immunity. *bioRxiv:2020.2001.2008.898346*
148. Snow GB, Boom RP, Delemarre JF, Bangert JA (1977) Squamous carcinoma of the oropharynx. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2:93-103
149. Stevanović S, Helman SR, Wunderlich JR, Langhan MM, Doran SL, Kwong MLM, Somerville RPT, Klebanoff CA, Kammula US, Sherry RM, Yang JC, Rosenberg SA, Hinrichs CS (2019) A Phase II Study of Tumor-infiltrating Lymphocyte Therapy for Human Papillomavirus-associated Epithelial Cancers. *Clin Cancer Res* 25:1486-1493
150. Subbarayan RS, Arnold L, Gomez JP, Thomas SM (2019) The role of the innate and adaptive immune response in HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 4:508-512
151. Sun L, Wang X, Saredy J, Yuan Z, Yang X, Wang H (2020) Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biol* 37:101759
152. Sun W, Li W-J, Fu Q-L, Wu C-Y, Lin J-Z, Zhu X-L, Hou W-J, Wei Y, Wen Y-H, Wang Y-J (2015) Functionally distinct subsets of CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with laryngeal squamous cell carcinoma are indicative of immune deregulation and disease progression. *Oncology reports* 33:354-362
153. Sun X, Zhang L, Liu S (2021a) The Immune Infiltration in HNSCC and Its Clinical Value: A Comprehensive Study Based on the TCGA and GEO Databases. *Comput Math Methods Med* 2021:1163250
154. Sun Y, Wang Z, Qiu S, Wang R (2021b) Therapeutic strategies of different HPV status in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Biol Sci* 17:1104-1118
155. Sun Z, Sun X, Chen Z, Du J, Wu Y (2022) Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Risk Factors, Molecular Alterations, Immunology and Peptide Vaccines. *Int J Pept Res Ther* 28:19
156. Suzuki H, Kawasaki Y, Miura M, Hatakeyama H, Shina K, Suzuki S, Yamada T, Suzuki M, Ito A, Omori Y (2022) Tumor Infiltrating Lymphocytes are Prognostic Factors and Can Be Markers of Sensitivity to Chemoradiotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 23:1271-1278
157. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, Porta-Pardo E, Gao GF, Plaisier CL, Eddy JA, Ziv E, Culhane AC, Paull EO, Sivakumar IKA, Gentles AJ, Malhotra R, Farshidfar F, Colaprico A, Parker JS, Mose LE, Vo NS, Liu J, Liu Y, Rader J, Dhankani V, Reynolds SM, Bowlby R, Califano A, Cherniack AD, Anastassiou D, Bedognetti D, Mokrab Y, Newman AM, Rao A, Chen K, Krasnitz A, Hu H, Malta TM, Noushmehr H, Pedamallu CS, Bullman S, Ojesina AI, Lamb A, Zhou W, Shen H, Choueiri TK, Weinstein JN, Guinney J, Saltz J, Holt RA, Rabkin CS, Lazar AJ, Serody JS, Demicco EG, Disis ML, Vincent BG, Shmulevich I (2018) The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* 48:812-830.e814
158. Turner CN, Mullins GN, Hoyer KK (2022) CXCR5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells: Potential immunotherapy targets or drivers of immune-mediated adverse events? *Frontiers in Medicine* 9
159. Vassilakopoulou M, Psyrris A, Argiris A (2015) Targeting angiogenesis in head and neck cancer. *Oral Oncol* 51:409-415
160. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ (2020) A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology* 20:651-668

161. Wang G, Zhang M, Cheng M, Wang X, Li K, Chen J, Chen Z, Chen S, Chen J, Xiong G, Xu X, Wang C, Chen D (2021) Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma: Functions and regulatory mechanisms. *Cancer Lett* 507:55-69
162. Wang Z, Jensen MA, Zenklusen JC (2016) A Practical Guide to The Cancer Genome Atlas (TCGA). *Methods Mol Biol* 1418:111-141
163. Weed DT, Walker G, De La Fuente AC, Nazarian R, Vella JL, Gomez-Fernandez CR, Serafini P (2013) FOXP3 subcellular localization predicts recurrence in oral squamous cell carcinoma. *PloS one* 8:e71908
164. Weed DT, Vella JL, Reis IM, Gomez C, Sargi Z, Nazarian R, Califano J, Borrello I, Serafini P (2015) Tadalafil Reduces Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells and Promotes Tumor Immunity in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tadalafil Beneficially Modulates the Immune System in HNSCC. *Clinical Cancer Research* 21:39-48
165. Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger BA, Ellrott K, Shmulevich I, Sander C, Stuart JM (2013) The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* 45:1113-1120
166. Weller P, Bankfalvi A, Gu X, Dominas N, Lehnerdt GF, Zeidler R, Lang S, Brandau S, Dumitru CA (2014) The role of tumour FoxP3 as prognostic marker in different subtypes of head and neck cancer. *Eur J Cancer* 50:1291-1300
167. Wondergem NE, Nauta IH, Muijlwijk T, Leemans CR, van de Ven R (2020) The Immune Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: on Subsets and Subsites. *Curr Oncol Rep* 22:81
168. Würdemann N, Wagner S, Sharma SJ, Prigge ES, Reuschenbach M, Gattenlöhner S, Klussmann JP, Wittekindt C (2017) Prognostic Impact of AJCC/UICC 8th Edition New Staging Rules in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol* 7:129
169. Xiang Y, Gong M, Deng Y, Wang H, Ye D (2023) T cell effects and mechanisms in immunotherapy of head and neck tumors. *Cell Communication and Signaling* 21:49
170. Xu Q, Wang C, Yuan X, Feng Z, Han Z (2017) Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Transl Oncol* 10:10-16
171. Yu C, Li Q, Zhang Y, Wen ZF, Dong H, Mou Y (2022) Current status and perspective of tumor immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Front Cell Dev Biol* 10:941750
172. Zätterström UK, Wennerberg J, Ewers SB, Willén R, Attewell R (1991) Prognostic factors in head and neck cancer: histologic grading, DNA ploidy, and nodal status. *Head Neck* 13:477-487
173. Zeng H, Song X, Ji J, Chen L, Liao Q, Ma X (2020) HPV infection related immune infiltration gene associated therapeutic strategy and clinical outcome in HNSCC. *BMC Cancer* 20:796
174. Zhang D, Tang D, Heng Y, Zhu XK, Zhou L, Tao L, Lu LM (2021) Prognostic Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Patients. *Laryngoscope* 131:E1249-e1255
175. Zhu S, Luo Z, Li X, Han X, Shi S, Zhang T (2021) Tumor-associated macrophages: role in tumorigenesis and immunotherapy implications. *J Cancer* 12:54-64

## 7 Publikationen

### Originalarbeit:

**Moritz Knebel**, Sandrina Körner, Jan Philipp Kühn, Silke Wemmert, Lukas Brust, Sigrun Smola, Mathias Wagner, Rainer M. Bohle, Luc G. T. Morris, Abhinav Pandey, Bernhard Schick, Maximilian Linxweiler **Prognostic impact of intra- and peritumoral immune cell subpopulations in head and neck squamous cell carcinoma – comprehensive analysis of the TCGA-HNSC cohort and immunohistochemical validation on 101 patients**

*Frontiers in Immunology (IF 8,786), under review*

### Vortrag:

**Moritz Knebel**, Dr. med. Jan-Philipp Kühn, Dr. rer. nat. Florian Bochen, Sandrina Körner M.Sc., Dr. rer. nat. Silke Wemmert, Priv.-Doz. Dr. med. Mathias Wagner, Luc G. T. Morris MD MSc FACS, Jingming Wang PhD, Prof. Dr. med. Bernhard Schick, Priv.-Doz. Dr. med. Maximilian Linxweiler **MHBA Untersuchungen zur prognostischen Relevanz tumorinfiltrierender Immunzellen bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten auf der Basis von RNAseq Daten der TCGA-HNSC-Kohorte und immunhistochemische Validierung an 101 Patienten**

*Präsentiert auf der DGHNO-Jahrestagung 2022, 25. bis 28. Mai 2022, Hannover*

## **8 Danksagung**

Ein großes Dankeschön geht an folgende Personen ohne deren Hilfe und Unterstützung die Umsetzung und Verfassung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Schick (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) außerordentlich für die Möglichkeit, meine Arbeit an seiner Klinik schreiben zu dürfen, die überaus freundliche Aufnahme und die hervorragende Betreuung sowie für die Überlassung des Arbeitsplatzes danken.

Herrn Prof. Dr. Maximilian Linxweiler (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) danke ich sehr für das Überlassen des Themas dieser Dissertationsarbeit, die überragende Unterstützung bei meiner Arbeit, die wahnsinnig schnelle Hilfe im Falle einer Frage oder eines Problems sowie für jegliche Anregungen und Hilfestellungen im Rahmen der Publikation dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht weiterhin auch an Frau Dr. rer.nat. Sandrina Körner, die mir sowohl im Labor wie auch in allen anderen Aspekten dieser Arbeit stets eine große Hilfe war und mir mit ihrer Expertise und stetiger Bereitschaft weiterhelfen konnte.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer nat. Florian Bochen (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) bedanken, der mir eine große Hilfe war.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer Bohle und Herrn PD Dr. Matthias Wagner (Klinik für Pathologie Universität des Saarlandes) für die Bereitstellung der FFPE-Gewebeschnitte, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Ulrike Bechtel und Frau Carolin Bick (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft während der Etablierung, den Versuchen und des Laboralltags.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und Michelle. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.



## **9 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 29.08.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Maximilian Linxweiler

Prof. Dr. Markus Hoth