

**Aus dem Pathologischen Institut**

**der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Andreas Rosenwald**

**Nachweis von PD-1 und PD-L1 in Plattenepithelkarzinomen  
des Larynx und Hypopharynx**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Tamara Jaklin**

**aus Idstein**

**Würzburg, April 2022**

**Referent:** Prof. Dr. med. Hans-Ullrich Völker

**Koreferent:** Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 13.12.2022

**Die Promovendin ist Ärztin**

# INHALT

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Historie der Checkpoint-Inhibitoren.....	1
1.2	PD-1 und PD-L1.....	2
1.2.1	Die biochemische Struktur.....	2
1.2.2	Die inhibitorische Funktion.....	4
1.3	Checkpoint-Inhibitoren aktuell.....	7
1.3.1	Datenlage zu PD-L1 und PD-1 in Larynx- und Hypopharynxkarzinomen.....	7
1.3.2	Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren.....	9
1.4	Fragestellungen.....	11
<b>2</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1	Patientenkollektiv.....	12
2.2	Tissue-Microarray-Herstellung.....	13
2.3	Schnitte und immunohistochemische Färbung.....	14
2.4	Auswertung.....	15
2.5	Statistik.....	19
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
3.1	Das Kollektiv.....	23
3.2	Markerexpression.....	27
3.3	Prognostische Hinweise.....	31
3.4	Zusammenhang zwischen den Markerexpressionen.....	41
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>44</b>
4.1	Nachweis von PD-L1 und PD-1.....	44
4.2	PD-L1 und prognostische Hinweise.....	52
4.3	Korrelationen zwischen PD-L1, PD-1 und CD5.....	57
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>61</b>
	<b>Appendix</b> .....	
	<b>I Abkürzungsverzeichnis</b> .....	
	<b>II Abbildungsverzeichnis</b> .....	
	<b>III Tabellenverzeichnis</b> .....	

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Historie der Checkpoint-Inhibitoren

Der Ursprung der Checkpoint-Inhibitoren lässt sich auf das Jahr 1987 zurückführen. Eine Gruppe französischer Wissenschaftler fand in Maus-T-Lymphozyten eine DNA-Sequenz, die für ein Protein der Immunglobulin-Superfamilie kodiert. Dieses Protein war CTLA-4 [2]. Vier Jahre später, im Jahr 1991, konnte gezeigt werden, dass das Antigen B7-1 sowohl von CD28 als auch von CTLA4 als Ligand gebunden wird [3-5]. Bei CD28 handelt es sich um ein Protein, das auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird [6]. Wird B7-1, das auf der Oberfläche von antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird, von CD28 gebunden, führt diese Komplexbildung zu einer Co-Stimulation und Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivierung in Verbindung mit einem T-Zell-Rezeptor (TCR) [7-10]. Allison und Krummel demonstrierten daraufhin im Jahr 1995, dass CTLA-4 eine inhibitorische Wirkung auf das Immunsystem hat und die Aktivität von T-Zellen herabsetzt. Damit war CTLA-4 nicht ein Co-Stimulator oder ein alternativer Signalweg für CD28, sondern sein Gegenspieler [11, 12].

Ein Jahr später, im Jahr 1996, zeigte Allison am Beispiel eines Mausmodells die Wirkung von Antikörpern gegen CTLA-4 bei Kolonkarzinomen. Die Tumore zeigten unter der anti-CTLA-4 Gabe einen deutlichen Regress [13]. Für seine Arbeit wurde er zusammen mit Tasuko Honjo im Jahr 2018 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet [14].

Der Weg für die Checkpoint-Inhibitoren war geebnet.

Am 13. Juli 2011 wurde Ipilimumab in der Europäischen Union als erster Checkpoint-Inhibitor für eine Tumorerkrankung zugelassen: das maligne Melanom. Diese Zulassung beschränkte sich zunächst auf Patienten, deren Erkrankung bereits fortgeschritten und vorbehandelt war [15], wurde aber im Jahr 2013 auf fortgeschrittene und unbehandelte Melanome erweitert [16]. Neben CTLA4 wurde noch ein weiteres Protein entdeckt, welches in der aktuellen Immuntherapie eine wichtige Rolle spielt.

Japanische Wissenschaftler stießen im Jahr 1992 auf ein Gen, das das Protein PD-1 kodiert [17]. In den Jahren 1999 und 2001 wurde PD-L1 als B7-H1 und PD-L2 als B7-DC beschrieben [18, 19], jedoch wurde erst jeweils ein Jahr später ihre Funktion als PD-1-Ligand aufgezeigt [20, 21]. Weiterhin konnte auch bei PD-1 die Wirkung auf das Immunsystem demonstriert werden; Knockout-Mäuse mit fehlendem PD-1-Gen zeigten im Verlauf eine Lupus-ähnliche Autoimmunerkrankung oder entwickelten eine dilatative

Kardiomyopathie [22, 23]. Kurz darauf konnte demonstriert werden, dass PD-L1 sich zum einen gehäuft in bestimmten Tumor-Entitäten (Lungenkarzinom, Ovarialkarzinom, Kolonkarzinom, malignes Melanom) zeigt und zum anderen eine immunsuppressive Wirkung aufweist [24]. Schließlich begann im Jahr 2006 die erste Phase 1-Studie, die sich mit der Blockade von PD-1 in der Antitumorthherapie auseinandersetzte [25]. Im Juni und Juli 2015 wurden Nivolumab und Pembrolizumab in der Europäischen Union als monoklonale Antikörper gegen PD-1 zugelassen [26, 27].

## **1.2 PD-1 und PD-L1**

### **1.2.1 Die biochemische Struktur**

**PD-1** (auch bekannt als CD279) gehört zu der großen Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie und dort zu der Untergruppe der CD28-Familie und zeigt zu dem Protein CD28 eine Sequenzähnlichkeit von ungefähr 20 %. Die Immunglobulin-Superfamilie zeichnet sich durch das Vorkommen von Aminosäuresequenzen ähnlich denen der Immunglobuline aus, in denen sie zuerst beschrieben wurde. Es werden zwei Domänen unterschieden: Die C-ähnliche-Domäne und die V-ähnliche-Domäne. Die CD28-Familie weist dabei eine Immunglobulin-ähnliche V-Domäne auf [28-31].

Ursprünglich wurde PD-1 in Verbindung mit Zellen beschrieben, bei denen der programmierte Zelltod induziert wurde. Dies führt zu dem Namen PD-1: „programmed cell death protein 1“ [17].

Strukturell ist PD-1 ein Typ-I-Transmembranrezeptor, bestehend aus 288 Aminosäuren. Das verantwortliche Gen heißt PDCD-1 und hat seine Lokalisation auf dem langen Arm von Chromosom 2 [32-34]. Das Protein umfasst drei Einheiten: eine extrazelluläre Domäne, die die IgV-Domäne beinhaltet, eine transmembrane Region und eine zytoplasmatische Domäne. Darüber hinaus besitzt PD-1 in seiner zytoplasmatischen Domäne ein immunrezeptor-tyrosinbasierendes-Inhibitionsmotiv (ITIM) gefolgt von einem immunrezeptor-tyrosinbasierendes-Tauschmotiv (ITSM) [17, 31, 35, 36]. Es findet sich eine Disulfid-Brücke zwischen der Aminosäure Cystein an Stelle 54 und einem Cystein an Stelle 123 des Proteins. Die zweite Disulfidbrücke, die von anderen Mitgliedern der CD28-Familie bekannt ist (z.B. CD28 oder CTLA4), fehlt [37].

Im Mausmodell konnte eine Expression von PD-1 auf den Zelloberflächen von Thymozyten und T-Zellen, sowie in B-Zellen nach Stimulation mit anti-CD3, Concanavalin A und anti-IgM-Antikörper nachgewiesen werden [38, 39]. Außerdem zeigte sich eine vermehrte Expression von PD-1 auf der Oberfläche von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bei Patienten mit einer Krebserkrankung im Verdauungstrakt (z.B. Leber oder Ösophagus), die mit einem schlechteren Outcome korrelierte [40].

Die Liganden **PD-L1** (oder B7-H1 bzw. CD274) und PD-L2 (oder B7-H2 bzw. CD273) gehören ebenfalls zu der großen Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie. Während PD-1 der CD28-Familie angehört, sind PD-L1 und PD-L2 der B7-Familie zuzuordnen. Anders als die CD28-Familie weisen die Mitglieder der B7-Familie jedoch V- und C-Domänen auf [28]. Dabei sind PD-L1 und PD-L2 nicht nur Liganden für PD-1. PD-L1 wird ebenso von B7-1 und PD-L2 vom Repulsive guidance molecule B (RGMb) gebunden [41, 42].

Strukturell handelt es sich bei PD-L1 ebenfalls um einen Typ I-Transmembranrezeptor bestehend aus 290 Aminosäuren. PD-L1 zeigt zwei Domänen der Immunglobulin-Superfamilie. Die Domäne 1 ist eine V-Domäne und die Domäne 2 eine C-Domäne. Hinzu kommt eine hydrophobe Transmembrandomäne und ein kurzer zytoplasmatischer Teil bestehend aus 30 Aminosäuren [18, 43]. Genetisch findet sich PD-L1 auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 [33, 44].

PD-L1 mRNA konnte in großen Mengen in folgenden Geweben detektiert werden: Herz, Skelettmuskel, Plazenta und Lunge [18]. In anderen Geweben, wie z.B. in Kolon, Nieren und Pankreas, war jedoch keine Expression von PD-L1 nachzuweisen. Dahingegen ließen sich PD-L1-tragende Makrophagen in Lunge, Leber und Tonsillen finden [24].

Weiterhin fand sich PD-L1 auf der Oberfläche von Endothelzellen. Dabei konnte eine vermehrte Expression nach Interferongabe beobachtet werden [45].

PD-L1 kommt in einigen Tumor-Entitäten gehäuft vor, darunter malignen Melanomen, Ovarialkarzinomen und Bronchialkarzinomen [24]. Auch in der Umgebung der Tumorzellen konnte eine vermehrte PD-L1-Expression beobachtet werden. Diese fand sich auf der Oberfläche von tumor-assoziierten-antigenpräsentierenden Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen, Fibroblasten und T-Zellen [46-48].

### 1.2.2 Die inhibitorische Funktion

In einem gesunden Organismus stellt das geregelte Zusammenspiel aus Aktivierung und Inaktivierung des Immunsystems einen essenziellen Bestandteil dar. Eine wichtige Funktion dabei zeigen die Immun-Checkpoints. Dabei konnte in Studien demonstriert werden, dass ein Funktionsverlust von PD-1 einen maßgeblichen Einfluss auf die immunologische Gesundheit hat: ein Verlust von PD-1 im Mausmodell führte zu Lupus-ähnlichen Erkrankungen und autoimmun bedingter dilatativer Kardiomyopathie [22, 23].

Der Mechanismus der Immunsuppression von PD-1 präsentiert sich nach bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen unter anderem wie folgt:

Neben der Interaktion des TCR mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex I oder II (MHC I/II) ist ein positiver oder negativer sekundärer Signalweg eine Voraussetzung für die weitere Tätigkeit der naiven T-Zelle [49, 50]. So resultiert zum Beispiel die Interaktion von PD-1 mit PD-L1 in einer inhibierenden und die Interaktion von CD28 mit B7-1/B7-2 in einer aktivierenden Funktion [4, 22, 23, 51].

Bindet PD-1 an seinen Liganden PD-L1, bilden diese einen 1:1-Komplex, der als Monomer vorliegt [31, 52]. Verschiedene Folgemechanismen wirken daraufhin in ihrer Gesamtheit immunsuppressiv.

Es erfolgt ein direktes Gegenspiel zum positiven Signal von CD28. Im Rahmen der T-Zell-Aktivierung mit CD28 spielt der PI3K/Akt-Signalweg eine entscheidende Rolle [53]. Hierbei erfolgt eine Hochregulierung der Expression des anti-apoptotischen Proteins „B-cell lymphoma – extra large“ (Bcl-xL) [54, 55]. Durch PD-1 hingegen wird PI3K inhibiert [36]. Dabei spielen „Src homology region 2 domain – containing phosphatase-1“ (SHP-1)- und „Src homology region 2 domain – containing phosphatase-2“ (SHP-2)-Phosphatasen in Verbindung mit den ITIM- und ITSM-Motiven in PD-1 eine zentrale Rolle [56, 57]. Allerdings scheint es als würden das ITSM Motiv in Kombination mit SHP-2 die wichtigeren Komponenten in der Signalweitergabe sein [57, 58]. Jedoch sind die exakten Vorgänge noch nicht vollständig verstanden. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass das Fehlen von SHP-2 keinen Einfluss auf die PD-1/PD-L1-Signalkaskade hat, was vermuten lässt, dass auch andere Phosphatasen im Signalweg mit eingebunden sind [59].

Auch andere Signalwege werden von PD-1 beeinflusst. So wird zum Beispiel die Phosphorylierung der „Zeta-chain-associated protein kinase 70“ (ZAP70) durch PD-1 inhibiert [56]. ZAP70 ist eine Proteintyrosin-Kinase, die ein zentrales Element in der T-Zell Aktivierung darstellt [60, 61].

Weiterhin reduziert PD-1 die Expression der Caseinkinase 2 (CK2). In Abwesenheit von PD-1 sorgt die CK2 für eine Inaktivierung von „Phosphatase and tensin homolog“ (PTEN). Durch die verminderte Expression von CK2 bleibt PTEN in seinem aktiven Zustand und kann Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3), das Produkt der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), dephosphorylieren. Somit inhibiert auch PTEN den PI3K/Akt-Signalweg [62].

Außerdem resultiert der Signalweg über PD-1 in einem Zellzyklusarrest der Lymphozyten in der G1-Phase. Die Ursache liegt in einer verminderten Transkription des „S-phase kinase-associated protein 2“ (SKP2). Weiterhin erfolgt eine Inhibierung der T-Zell-Proliferation und eine Zellzyklusblockade über den Ras- und den MEK-ERK-Signalweg [63, 64].

Ebenso konnte gezeigt werden, dass PD-1/PD-L1 eine Downregulierung des TCR in CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zur Folge hat [65] und zu einer gesteigerten Effektivität von induzierten regulatorischen T-Zellen (induced regulatory T cells oder iTregs) führt [66]. Regulatorische T-Zellen (Tregs) unterdrücken Effektorzellen und verhindern das Auftreten von Autoimmunität. Es wird zwischen natürlichen Tregs (nTregs), die im Rahmen der T-Zell-Reifung im Thymus gebildet werden, und iTregs, die sich erst in der Peripherie aus naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen entwickeln [67-70], unterschieden (Abbildung 1).

Alles in allem resultieren die verschiedenen Signalwege von PD-1 in einer verminderten Zytokinproduktion, einer verminderten T-Zell-Proliferation, einer T-Zell-Anergie, einem Zellzyklusarrest und einer verminderten Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-xL [57, 63, 64, 71].



PD-L1-positiven (PD-L1+) Fällen [73], dass nicht nur der PD-1/PD-L1-Signalweg entscheidend für die inhibitorische Funktion ist. Weitere unbekannte Faktoren müssen in diesem Kontext eine Rolle spielen.

### 1.3 Checkpoint-Inhibitoren aktuell

#### 1.3.1 Datenlage zu PD-L1 und PD-1 in Larynx- und Hypopharynxkarzinomen

Der Anteil der Karzinome der Mundhöhle, des Rachens und des Kehlkopfes gemessen an den Krebsneuerkrankungen aus dem Jahr 2016 in Deutschland liegt bei Männern bei 5 % und bei Frauen bei 2 % [74]. Als Hauptrisikofaktoren für das Larynx- und Hypopharynxkarzinom gelten Nikotin und Alkohol, vor allem in Kombination [75, 76]. Das Plattenepithelkarzinom ist der häufigste Subtyp des Larynx- und Hypopharynxkarzinoms [77]. Dabei zeigt sich epidemiologisch im Bericht des Robert-Koch-Instituts zum Krebsgeschehen in Deutschland aus dem Jahr 2016 eine gleichbleibende altersstandardisierte Inzidenz zwischen den Jahren 2003 und 2016 bei den Frauen. Bei den Männern hingegen zeigt sich eine sinkende Inzidenz gegenüber den Vorjahren [78] (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Inzidenzen der Larynx- und Hypopharynxkarzinome in den Jahren 2003, 2006, 2010, 2013 und 2016 für Männer (M) und Frauen (W)**

Altersstandardisierte Rate pro 100.000 Einwohner in Deutschland.

Quelle: eigene Darstellung. Daten aus der Datenbankabfrage des Zentrums für Krebsregisterdaten und des Robert-Koch-Instituts [79].

	2003	2006	2010	2013	2016
<b>Larynx - W</b>	0,9	1,1	0,8	1,0	0,8
<b>Larynx - M</b>	7,4	7,7	6,5	5,5	5,4
<b>Hypopharynx - W</b>	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3
<b>Hypopharynx - M</b>	3,0	2,8	2,6	2,2	1,9

Das Larynx- und vor allem das Hypopharynxkarzinom werden häufig zusammen mit den anderen malignen Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches zusammengefasst, was eine Übersicht über die Expressionsraten von PD-L1 gezielt in diesen beiden Entitäten erschwert. Im näheren Vergleich verschiedener veröffentlichter Studien fallen inhomogene Ergebnisse auf; die Expression von PD-L1 in Plattenepithelkarzinomen des

Kopf- und Halsbereiches (HNSCC) zeigt dabei eine Spannweite von 29,5 – 100 % PD-L1+ Tumore innerhalb der Stichproben (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Vergleich verschiedener Studien zur Expressionsrate von PD-L1 in HNSCC**

Verglichen werden die Stichprobengröße n; der Cut-Off-Wert: die Entscheidungsgrenze in Prozent, ab der der Befund als positiv zu werten ist; die Anzahl positiver Befunde innerhalb der Stichprobe in Prozent.

Quelle: eigene Darstellung

<b>Studie</b>	<b>Stichprobengröße</b>	<b>Cut-Off-Werte</b>	<b>% Positiv</b>
Balermipas et al. [80] (2017)	n = 161	≥ 5 %	63 %
Birtalan et al. [81] (2018)	n = 100	jegliche Färbung	31 %
Burtness et al. [82] (2019)	n = 882	CPS (Combined Positive Score)	85 %
Müller et al. [83] (2017)	n = 98	jegliche Membranfärbung	94,9 %
	n = 195		84,61 %
Sanchez-Canteli et al. (2020) [84]	n = 372	≥ 1 % Membranfärbung	29,5 %
Schneider et al. [85] (2018)	n = 125	≥ 5 % Membranfärbung	36 %
Straub et al. [86] (2016)	n = 80	≥ 5 % Membranfärbung	45 %
Yu et al. [87] (2018)	n = 69	≥ 6 %	100 %

Ähnlich verhält es sich mit der Expression von PD-1 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) (Tabelle 3). Hier zeigt sich eine Spannweite von 30 % – 90,3 % PD-1 positiven Ergebnissen in den Stichproben.

**Tabelle 3: Vergleich verschiedener Expressionsraten von PD-1 auf Lymphozyten bei HNSCC**

Die mit \* versehenen Studien werten lediglich die TIL oder TIMC (tumorinfiltrierenden mononukleäre Zellen); die mit + versehenen Studien betrachten die PD-1+ Lymphozyten im Stroma. Verglichen werden die Stichprobengröße n; der Cut-Off-Wert: die Entscheidungsgrenze in Prozent, ab der der Befund als positiv zu werten ist; die Anzahl positiver Befunde innerhalb der Stichprobe in Prozent.

Quelle: eigene Darstellung

Studie	Stichprobengröße	Cut-Off-Werte	% Positiv
*Balermipas et al.[80] (2017)	n = 161	> Keine oder sporadische Zellen	45,3%
*Birtalan et al. [81] (2018)	n = 102	≥ 1% positive TIMC	30%
+Sanchez-Canteli et al. (2020) [84]	n = 372	≥ 1% der stromalen Lymphozyten	47,5%
*Schneider et al. [85] (2018)	n = 124	> 5 positive TIL in 3 HPF (high power fields)	90,3%

In allen Studien wurden verschiedene Antikörper für die Immunhistochemie (IHC) verwendet; ebenso unterscheiden sich die Cut-Off-Werte, die Stichprobengrößen sowie zu Teilen die Einschlusskriterien.

Auch die Verifizierbarkeit von PD-L1 als prognostischer Biomarker in HNSCC zeigt in der Literatur keine eindeutige Tendenz. In manchen Veröffentlichungen finden sich signifikante Ergebnisse hinsichtlich prognostischer Aussagen, die jedoch in anderen Studien nicht bestätigt werden konnten. So wurde von Müller et al. ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und PD-L1 sowie der Lokalisation und PD-L1 detektiert [85], Schneider et al. hingegen konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Lymphknotenstatus und PD-L1 nachweisen [83].

### 1.3.2 Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren

Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Körperzellen durch genetische und epigenetische Veränderungen [88]. Diese Veränderungen führen unter anderem zu unkontrolliertem Wachstum, Migration in zellfremdes Gewebe mit Metastasierung, unlimitedem Replikationspotential und Expression von Tumorantigenen auf der Zelloberfläche [89, 90].

Das gesunde Immunsystem ist prinzipiell in der Lage eine Krebszelle durch diese Tumorantigene von einer regelrechten Körperzelle zu unterscheiden. Doch durch immunsuppressive Maßnahmen, z.B. durch die Präsentation von PD-L1 auf der Zelloberfläche, können maligne Tumorzellen diesem entgehen. Dieses Phänomen wird „immune escape“ genannt [91, 92].

In der modernen Tumorthherapie stellen diese Oberflächenproteine zeitgleich eine weitere spezifische Therapiemöglichkeit dar. Dabei können monoklonale Antikörper sowohl PD-1 als auch PD-L1 binden und die inhibitorischen Signalkaskaden stoppen. Bisher in der EU zugelassen sind die Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab, Cemiplimab und Pembrolizumab gegen PD-1 und Avelumab, Atezolizumab und Durvalumab gegen PD-L1. Diese ermöglichen die Therapie verschiedener fortgeschrittener oder inoperabler Tumore; darunter z.B. das maligne Melanom, das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC), das Urothelkarzinom oder das triple-negative Mammakarzinom. Für die Therapie von HNSCC sind aktuell Nivolumab und Pembrolizumab zugelassen [26, 27, 93-96].

Nivolumab hat in Studien zudem einen Vorteil gegenüber Chemotherapien bei therapieresistenten HNSCC und NSCLC gezeigt [97, 98]. Darüber hinaus wird in der S3-Leitlinie für Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Larynxkarzinoms empfohlen, dass Nivolumab als Zweitlinientherapie in der palliativen systemischen Therapie angeboten werden sollte. Dies basiert unter anderem auf der durch Nivolumab deutlich gesteigerten 1-Jahres-Überlebensrate von 16,6 % auf 36 % und einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben [97, 99].

Patienten, deren Tumore PD-L1+ waren, zeigten darüber hinaus ein schlechteres Outcome im Vergleich zu Patienten mit PD-L1- Tumoren. Dabei konnte ein vermindertes Gesamtüberleben im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Diese Beobachtung wurde unter anderem bei der Untersuchung von Blasenkarzinomen, NSCLC und HNSCC gemacht [83, 100, 101].

Entsprechend dem Mechanismus der Checkpoint-Inhibitoren zeigen sich Nebenwirkungen der Therapie als Folge der körpereigenen Immunantwort. Mögliche Nebenwirkungen sind Hautreaktionen, gastrointestinale Beschwerden, Hepatitiden oder Pankreatitiden [102].

## 1.4 Fragestellungen

Checkpoint-Inhibitoren haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dabei konnten sie sich weiter etablieren und stellen für bereits weit fortgeschrittene Karzinome eine zusätzliche Behandlungsmöglichkeit dar, so dass sie heute aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken sind.

Trotz der sich immer weiter entwickelnden Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahren sind die relativen 5-Jahres-Überlebensraten von 61 % (Männer) bzw. 63 % (Frauen) für das Larynxkarzinom und 47 % (Männer) bzw. 63 % (Frauen) für Karzinome der Mundhöhle und des Rachens nicht zufriedenstellend [103].

Aus diesen Gründen ist es von grundlegender Bedeutung prognostische und prädiktive Marker zu detektieren, die helfen könnten, den Verlauf der Erkrankung einzuschätzen und die Therapiemöglichkeiten zu optimieren. Ein möglicher Marker stellt PD-L1 dar, der bereits in vielen Tumorentitäten untersucht und diskutiert wurde. Die Datenlage stellt sich aktuell für die Karzinome des Kopf- und Halsbereiches und insbesondere für Larynx- und Hypopharynxkarzinome begrenzt und inhomogen dar.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit folgenden Fragestellungen:

- 1) In welchen quantitativen Ausmaßen lassen sich PD-L1 und PD-1 in Plattenepithelkarzinomen von Hypopharynx und Larynx nachweisen?
- 2) Lassen sich aus den Daten des verwendeten Kollektivs und der Expression von PD-L1 prognostische Hinweise ableiten?
- 3) Liegt ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von PD-L1, PD-1 und CD5 (als Marker für Lymphozyten) in Plattenepithelkarzinomen von Larynx und Hypopharynx vor?

## **2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Patientenkollektiv**

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Kollektiv mit den zugehörigen epidemiologischen Daten wurde bereits in einer anderen Dissertation verwendet – „Expression von GLUT-1, p-Akt, M2-PK und p53 in Plattenepithelkarzinomen des Larynx und Hypopharynx“ von Jennifer Ariane Ringeling, Würzburg 2011.

Die Einschlusskriterien wurden hierbei wie folgt gewählt:

- Plattenepithelkarzinom des Larynx oder Hypopharynx
- Komplette Laryngektomie mit Neck-Dissection (außer bei pT1)
- Verfügbarkeit von epidemiologischen Patienten- und Verlaufsdaten
- Tumormaterial als Paraffinblock im Archiv des Pathologischen Instituts verfügbar

Das Kollektiv beinhaltet 118 Patientenfälle. Die Patienten wurden zwischen 1996 und 2005 in der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde in Würzburg behandelt. Außer bei den Patienten mit pT1 wurden alle Patienten mit einer kompletten Laryngektomie und Neck-Dissection therapiert. Für die Auswertung der Daten wurden die Patientenakten verwendet [104].

Die für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Datensätze sind irreversibel anonymisiert. Rückschlüsse auf einzelne Patienten sind aufgrund eines ungewöhnlich seltenen Verlaufes jedoch theoretisch möglich. Nach Rücksprache mit der Ethikkommission konnte auf ein Ethikvotum verzichtet und eine Unbedenklichkeitsbescheinigung ausgestellt werden.

Die vorliegenden epidemiologischen Daten umfassen das Alter der Patienten bei Erstdiagnose, das Geschlecht, die Überlebenszeit in Monaten ab Operationszeitpunkt, die Lokalisation (Larynx oder Hypopharynx), die Tumorgöße (in cm und pT-Stadien), die Anzahl der metastasierten Lymphknoten (N-Stadien) und die Differenzierungsgrade (Grading). Hinsichtlich der Überlebenszeit wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt, dabei war der begonnene Monat maßgeblich. Die Gruppeneinteilung verlief wie folgt:

- Patienten, die im Zeitraum von 1996-2005 verstarben
- Patienten, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (2005) am Leben waren
- Patienten, über deren weiteren Krankheitsverlauf keine näheren Informationen vorlagen – „last seen“ (hier wurden die Monate bis zur letzten Datenerfassung gezählt)

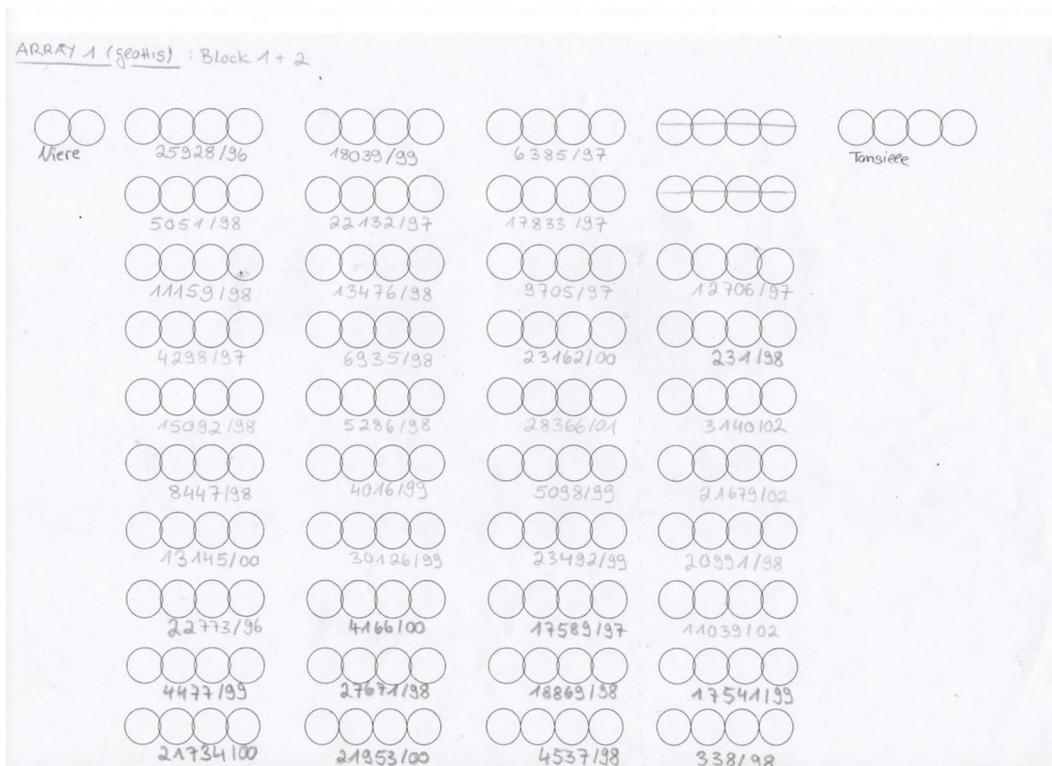
Bei den eingeschlossenen Patienten konnte im Rahmen des Stagings vor Operation keine Fernmetastasierung nachgewiesen werden.

Die pT- und N-Stadien richteten sich nach der damals gültigen TNM-Klassifikation maligner Tumore.

## **2.2 Tissue-Microarray-Herstellung**

Für die Herstellung der Tissue-Microarrays (TMA) wurden die asservierten Paraffinblöcke der Patiententumore herangezogen. Bereits vorliegende Mikrotomschnitte in Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden verwendet, um die vordokumentierte Diagnose mit Tumorgrading zu überprüfen. Auf dem Block erfolgte die Markierung der Tumoreale anhand korrespondierender Tumorschnitte. Die Gewebsstanzen wurden mit dem Gewebe-Stanzgerät von Beecher Instruments (Silver Spring, MD, USA) hergestellt. Der Durchmesser der Stanzzylinder betrug 0,6mm. Diese wurden in entsprechende Slots eines TMA-Paraffinblocks eingefügt. Insgesamt wurden 4 Arrays und 4 Duplikate hergestellt. Für den Zweck einer sicheren Orientierung im TMA wurden an der einen Seite des TMA-Paraffinblocks zwei Stanzungen aus Nierengewebe aufgebracht. Auf der anderen Seite wurden vier Stanzungen aus Tonsillengewebe eingesetzt. Vier Einzelstanzen bilden eine komplette Tumorserie (Abbildung 2). Zwischen diesen Einzelstanzen lagen jeweils 1 mm Abstand.

Von Larynx- und Hypopharynxkarzinomen wurden je zwei Arrays angefertigt.



**Abbildung 2: Beispiel eines Stanzschemas.**

Zur Orientierung sind auf der linken Seite die beiden Stanzungen des Nierengewebes und auf der rechten Seite die vier Stanzungen des Tonsillengewebes. Unter den jeweiligen vier Einzelstanzungen findet sich die zugehörige Fallnummer.

### 2.3 Schnitte und immunohistochemische Färbung

Es wurden 2-5 µm dicke Gewebsschnitte aus den TMA -Paraffinblöcken hergestellt und auf silanisierte Objektträger (Superfrost, Langenbrinck, Emmendingen, Germany) übertragen. Die Schnitte erfolgten mit einem Schlittenmikrotom und wurden sieben Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Für die anschließenden IHC-Färbungen wurden verschiedene Antikörper verwendet.

Für die PD-L1-Färbung wurde der Klon QR1 der Firma Quartett in der Verdünnung 1:200 verwendet. Der Klon SP269 der Firma Abcam in der Verdünnung 1:100 wurde für die Färbung von PD-1 verwendet und für die CD5-Färbung wurde der Klon 4C7 der Firma Leica Biosystems in der Verdünnung 1:40 verwendet.

## 2.4 Auswertung

### PD-L1

Der verwendete Score für PD-L1 richtet sich nach dem Cologne-Score [105]. Dieser Score wurde ursprünglich für das Adeno- und Plattenepithelkarzinom der Lunge entwickelt und beinhaltet ein 6-Stufen-System. Das System orientiert sich an der prozentualen Ausprägung PD-L1+ Zellen innerhalb eines Tumorzellverbandes zur Quantifizierung der Expression. Die sechs Stufen des Cologne-Scores wurden in dieser Arbeit übernommen und um die letzte Begrenzung zum „erweiterten Cologne Score“ mit sieben Stufen erweitert (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Einteilung des erweiterten Cologne-Scores.**

Der erweiterte Cologne-Score basiert auf dem ursprünglichen Cologne-Score, entwickelt von Scheel et al., und wurde um die Stufe 6 erweitert.

Quelle: eigene Darstellung, basierend auf dem Cologne -Score [105]

Stufen:	0	1	2	3	4	5	6
Grenzwerte:	< 1 %	1 - 4 %	5 - 9 %	10 - 24 %	25 - 49 %	50 - 79 %	≥ 80 %
Col.-Score:	< 1 %	1 - 4 %	5 - 9 %	10 - 24 %	25 - 49 %	≥ 50 %	-

Darüber hinaus wurde der modifizierte Cologne-Score generiert. Hierbei wurden die Stufen 1 bis 6 des erweiterten Cologne-Scores auf zwei Stufen reduziert, um eine annähernd gleiche Gruppengröße und damit eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen. Konkret wurden die Stufen 1-3 (25 % oder weniger Tumorzellen wurden angefärbt) und die Stufen 4-6 (mehr als 25 % der Tumorzellen wurden angefärbt) zusammengefasst.

Neben dem genannten Cologne-Score, welcher wie der Tumor Proportion Score (TPS), zur Auswertung die Anzahl der Tumorzellen in Prozent verwendet, haben sich noch der so genannte CPS und der Immune Cell Score (IC-Score) etabliert. Im Falle des CPS werden die PD-L1+ Tumor- und Immunzellen zusammengefasst und im Verhältnis zu allen vitalen Tumorzellen betrachtet; bei Anwendung des IC-Score wird die Gesamtumorfläche, welche PD-L1+ infiltrierende Immunzellen zeigt, im Verhältnis zu allen vitalen Tumorzellen betrachtet [106].

Obwohl neben dem TPS auch der CPS sich in der aktuellen Therapieleitlinie des HNSCC etabliert hat, orientiert diese Arbeit sich lediglich an der prozentualen Anzahl der PD-L1+ Tumorzellen ohne Berücksichtigung der PD-L1+ Immunzellen. Die Ursache liegt darin, dass in diesem Kontext eine Auswertung mittels CPS nicht adäquat möglich wäre. Dies hat seine Ursache in Folgendem: In den TMAs zeigt sich nicht immer Stroma, was die

Anwendung des CPS erschwert und somit in diesem Fall die alleinige Beurteilung der Tumorzellen mittels des Cologne-Scores den qualitativ besseren Weg darstellt.

Weiterhin wurde zwischen der Färbeintensität differenziert. Färbungen, die eine starke Färbeintensität aufwiesen, erhielten die Zusatzbezeichnung „h“ für „high intensity“. Dementsprechend erhielten Färbungen mit schwacher Färbeintensität die Zusatzbezeichnung „l“ für „low intensity“.

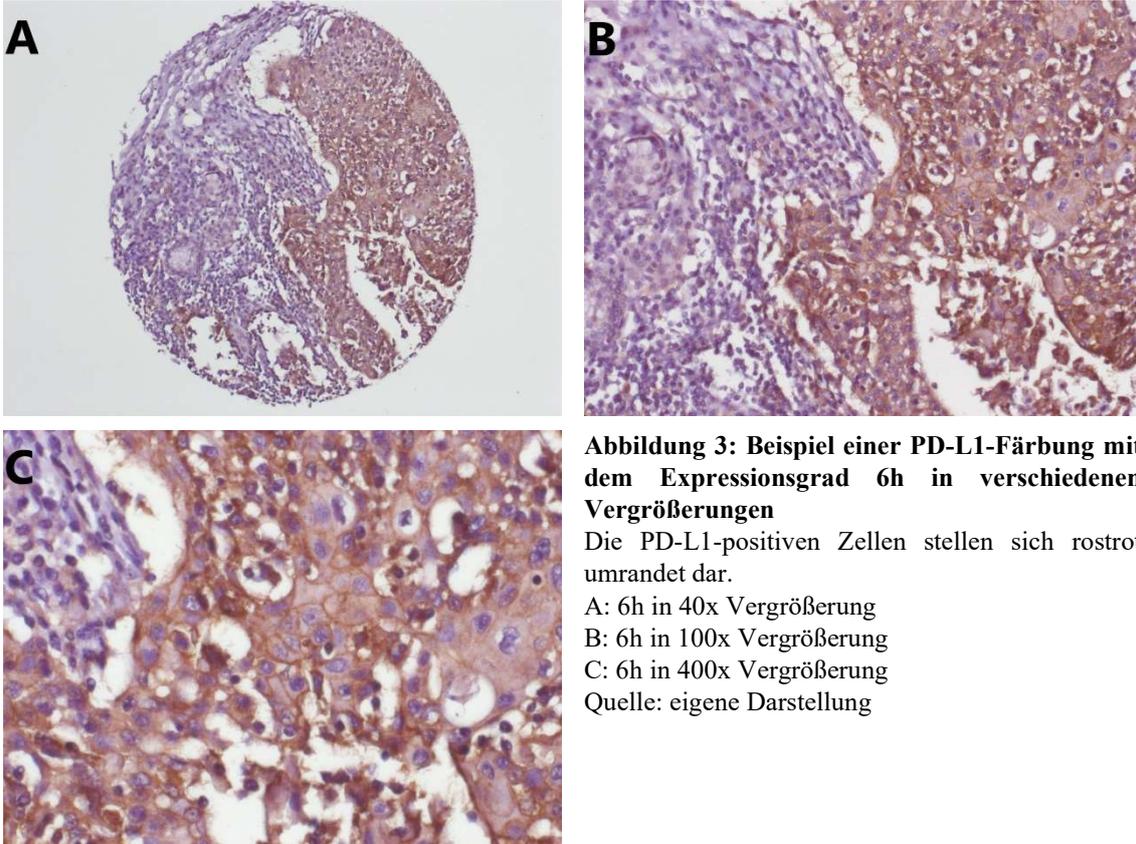
Dabei wurden nur Membranfärbungen in der Auswertung berücksichtigt, Zytoplasmafärbungen wurden wie „keine Färbung“ behandelt.

Durch die Kombination des erweiterten Cologne-Scores und der Färbeintensität ergaben sich 13 verschiedene Ausprägungsgrade (Tabelle 5). Der höchste Ausprägungsgrad lag bei 6h (Abbildung 3), der niedrigste bei 0. Nicht auswertbare Stenzen wurden markiert und in der weiteren statistischen Auswertung nicht berücksichtigt. Bei der Auswertung erfolgte die Beurteilung der Färbungen ohne Kenntnis über das Stadium der Erkrankung.

**Tabelle 5: Die 13 verschiedenen möglichen Ausprägungsgrade der PD-L1-Auswertung**

In der Tabelle werden die 13 verschiedenen möglichen Ausprägungsgrade in der PD-L1-Auswertung aufgelistet. Es handelt sich um eine Kombination aus dem erweiterten Cologne-Score – Stufe 0 bis 6 – und der Färbeintensität – low intensity und high intensity.

<b>Stufe / Färbeintensität</b>	<b>low intensity</b>	<b>high intensity</b>
0	0	0
1	1l	1h
2	2l	2h
3	3l	3h
4	4l	4h
5	5l	5h
6	6l	6h



**Abbildung 3: Beispiel einer PD-L1-Färbung mit dem Expressionsgrad 6h in verschiedenen Vergrößerungen**

Die PD-L1-positiven Zellen stellen sich rostrot umrandet dar.

A: 6h in 40x Vergrößerung

B: 6h in 100x Vergrößerung

C: 6h in 400x Vergrößerung

Quelle: eigene Darstellung

### PD-1 und CD5

Die PD-1- und CD5-Färbungen wurden anders als die PD-L1-Färbung nicht mit Hilfe eines vorgetesteten Scores ausgewertet. Es wurden in dieser Arbeit vier Expressionsstufen festgelegt:

0 = keine Färbung im Präparat (0 % der Fläche);

1 = einzeln angefärbte Lymphozyten im Präparat (< 1 % der Fläche);

2 = intermediäre angefärbte Lymphozyten im Präparat (1 – 30 % der Fläche);

3 = viel angefärbte Lymphozyten im Präparat (> 30 % der Fläche).

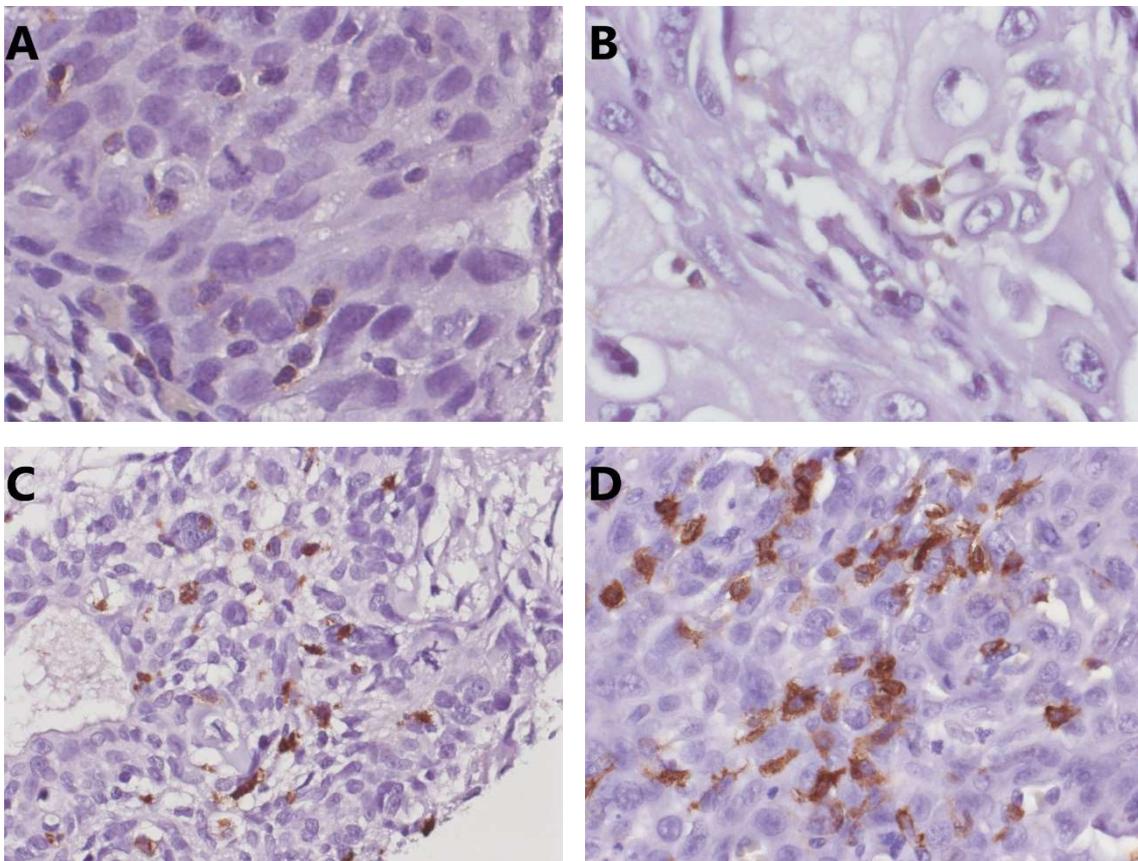
Weiterhin erfolgte eine Unterscheidung hinsichtlich der Lage der gefärbten Lymphozyten zum Tumorzellverband. Es wurde die Zusatzbezeichnung i = „intra“ für angefärbte Lymphozyten innerhalb des Tumorzellverbands vergeben. Die Bezeichnung p = „peripher“ wurde für angefärbte Lymphozyten benachbart des Tumorzellverbands verwendet.

Die Bewertung bestand numerisch von 0 bis 3, die weiterhin den Zusatz p und/oder i erhielten. Beispiele zeigen Tabelle 6 und Abbildungen 4 und 5.

**Tabelle 6: Beispiele der Auswertung von PD-1 und CD5 anhand von drei Kollektivfällen**

<b>Fall</b>	<b>PD-1</b>	<b>CD5</b>
E/03/9782	2p/2i	3p/2i
E/01/24364	3p/0i	3p/0i
E/01/7607	0p/1i	2p/1i

Auch im Falle von PD-1 und CD5 erhielten nicht auswertbare Fälle keine Bezeichnung und wurden in der weiteren statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.



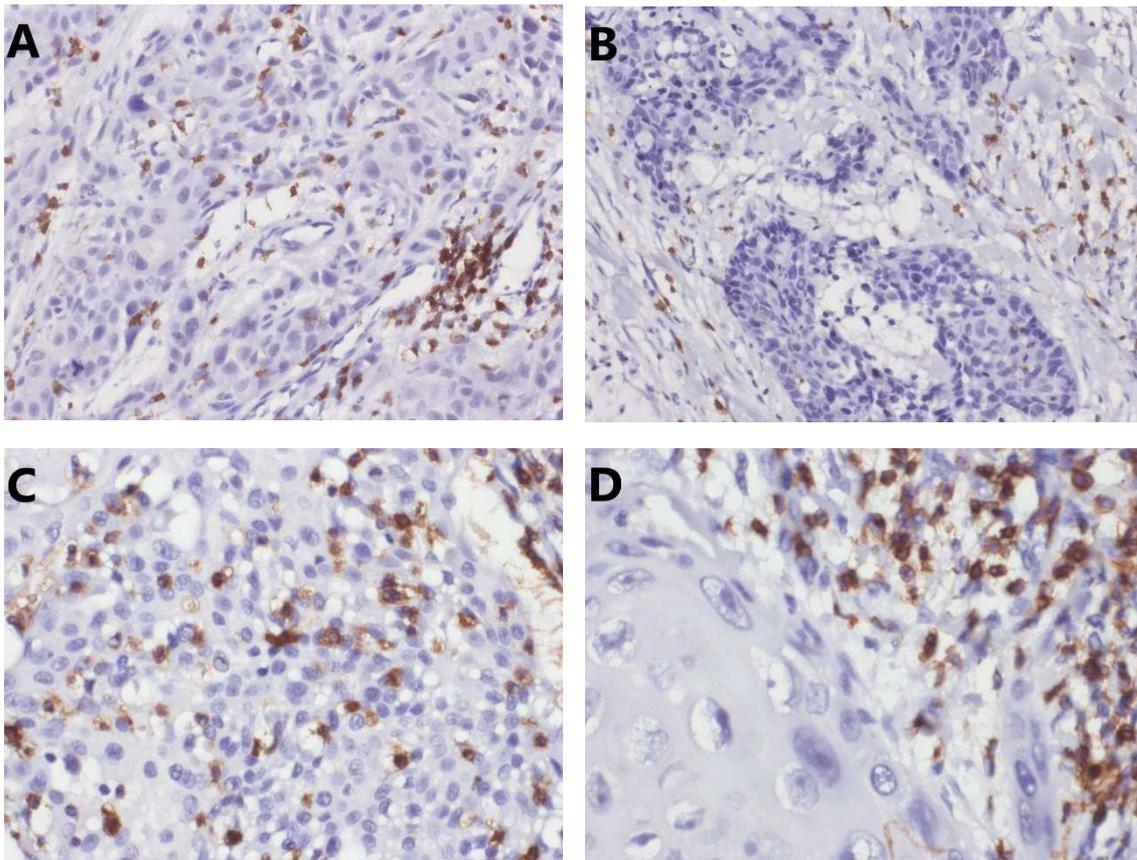
**Abbildung 4: Beispiele verschiedener PD-1-Färbungen mit unterschiedlichen Ausprägungsgraden**

A: 1i in 400x Vergrößerung

B: 1i in 400x Vergrößerung

C: 2i in 100x Vergrößerung

D: 3i in 400x Vergrößerung



**Abbildung 5: Beispiele verschiedener CD5-Färbungen mit unterschiedlichen Ausprägungsgraden**

A: 1i in 100x Vergrößerung

B: 1p in 100x Vergrößerung

C: 2i in 400x Vergrößerung

D: 3p in 400x Vergrößerung

## 2.5 Statistik

Die bereits vorhandenen Daten des Kollektivs sowie die Ergebnisse der IHC-Untersuchung wurden in einem gemeinsamen Excel-File (Microsoft Office Excel 2016) zusammengeführt, mit dem auch die Erhebung der deskriptiven Statistik erfolgte. Die induktive Statistik wurde mit „IBM SPSS Statistics 25“ durchgeführt.

### Deskriptive Statistik

Zunächst erfolgte die Betrachtung des Gesamtkollektivs. Es wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane von Erkrankungsalter und Überleben bestimmt. Zusätzlich wurde hinsichtlich des Erkrankungsalters 10-Jahres-Gruppen erstellt. Außerdem erfolgte die Bestimmung des 5-Jahres-Überlebens des Kollektivs.

Weiterhin wurden die absoluten und prozentualen Werte von Geschlecht, Lokalisation und Lymphknotenbeteiligung bestimmt. Die Daten des Kollektivs wurden nach

Einteilung in die entsprechende Lokalisation (Larynx/Hypopharynx) einzeln betrachtet. Dabei wurden die absoluten und prozentualen Werte von Geschlecht, Lymphknotenbeteiligung, T-Stadium, Grading, sowie der Überlebenszeit und Erkrankungsalter erhoben.

Anschließend erfolgte die Auswertung der Markerexpressionen. Bei allen Markerexpressionen erfolgte die Angabe der Ergebnisse in prozentualen und absoluten Zahlenwerten. Im Falle von PD-L1 handelte es sich um die generelle Angabe nach positiven bzw. negativen Färbungen. Weiterhin wurden die positiven Fälle zwischen starker und schwacher Färbereaktion unterschieden. Anschließend erfolgte die Zuweisung zu den einzelnen Gruppen des erweiterten Cologne-Scores. Darüber hinaus wurde die absolute und prozentuale Häufigkeit PD-L1+ bzw. PD-L1- Färbungen hinsichtlich verschiedener Parameter untersucht: Geschlecht, Lokalisation, Erkrankungsstadium und Grading. Dies wurde ebenso mit dem modifizierten Cologne-Score durchgeführt.

Im Falle von PD-1 erfolgte zunächst die Angabe der absolut und prozentual positiv ausgewerteten Färbereaktionen im Verhältnis zur Lokalisation (keine Färbung, positive Färbung innerhalb und/oder benachbart des Tumorzellverbandes). Anschließend wurden die PD-1-positiven Fälle erfasst, die ebenfalls eine positive bzw. negative PD-L1-Färbung aufwiesen.

Im Falle von CD5 wurden lediglich die absolut und prozentual positiv ausgewerteten Färbereaktionen im Verhältnis zur Lokalisation betrachtet.

### **Induktive Statistik**

In allen angewandten Tests wurde  $\alpha = 0,05$  als Signifikanzniveau gewählt. Da das Kollektiv eine Gruppengröße von mehr als 30 Fällen aufweist, wurde von einer Normalverteilung ausgegangen [107].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende statistische Tests verwendet:

Der **Pearson-Chi<sup>2</sup>-Test** wurde für die Frage nach Zusammenhängen zwischen dem PD-L1-Status/ der prozentualen Anzahl von PD-L1 und dem Erkrankungsstadium nach damals gültiger TNM-Klassifikation bzw. dem Differenzierungsgrad herangezogen. Die Daten waren nominal- (PD-L1-Status) bzw. ordinalskaliert (Erkrankungsstadium, Differenzierungsgrad, modifizierter Cologne Score). Die Freiheitsgrade waren größer 1

bei einer erwarteten Zellohufigkeit von größer 5. Für die Effektstärke wurde Cramers V bestimmt, Werte von  $\geq 0,3$  wurden als starker Zusammenhang gewertet [108].

Die **Korrektur nach Yates** wurde für die Frage nach Zusammenhängen zwischen dem PD-L1-Status/ der prozentualen Anzahl von PD-L1 und dem Sitz des Primärtumors bzw. für die Frage nach einem Zusammenhang zwischen dem PD-L1-Status und der Lymphknotenmetastasierung angewandt. Die Daten waren nominal- (Sitz des Primärtumors, PD-L1-Status) bzw. ordinalskaliert (Lymphknotenmetastasierung, modifizierter Cologne Score). Die Freiheitsgrade waren gleich 1 bei einer erwarteten Zellohufigkeit von größer 5. Für die Effektstärke wurde Phi bestimmt, Werte von  $\geq 0,3$  wurden als starker Zusammenhang gewertet [108].

Der **exakte Test nach Fisher** wurde für die Frage nach Zusammenhängen zwischen dem PD-L1-Status/ der prozentualen Anzahl von PD-L1 und dem Geschlecht bzw. für die Frage nach einem Zusammenhang zwischen der prozentualen Anzahl von PD-L1 und der Lymphknotenmetastasierung verwendet. Die Daten waren nominal- (Geschlecht, PD-L1-Status) bzw. ordinalskaliert (Lymphknotenmetastasierung, modifizierter Cologne Score). Die Freiheitsgrade waren gleich 1 bei einer erwarteten Zellohufigkeit von 5 oder kleiner. Für die Effektstärke wurde Phi bestimmt, dabei beschrieben Werte von  $\geq 0,3$  einen starken Zusammenhang [108].

Für die Frage nach Unterschieden bezüglich des Erkrankungsalters und des PD-L1-Status bzw. der Anzahl an positiv gefärbten PD-L1-Zellen wurde **der t-Test für unabhängige Stichproben** verwendet. Die Voraussetzung der Varianzhomogenität war gegeben. Für die weitere Verifizierbarkeit des Ergebnisses wurde die Effektstärke nach Cohen berechnet. Es galt:  $r = 0,1$  bis  $r = 0,29$  entsprach einem schwachen Effekt,  $r = 0,3$  bis  $r = 0,49$  entsprach einem mittleren Effekt und  $r = \geq 0,5$  entsprach einem starken Effekt [109].

Für die Frage nach Unterschieden im Überleben zwischen PD-L1+ und PD-L1- Fällen bzw. zwischen der Anzahl an positiv gefärbten PD-L1-Zellen wurden **Kaplan-Meier-Kurven** verwendet. Um die Kurven statistisch zu bewerten wurde der **Log-rank-Test** herangezogen [110].

Für die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen zwei ordinalskalierten Variablen wurde die **Rangkorrelation nach Spearman** verwendet. Im Detail wurde dieser Test für die Fragestellung nach Zusammenhängen zwischen der quantitativen Ausprägung von

CD5+ und PD-1+ Zellen innerhalb und benachbart des Tumorverbandes aber auch zwischen dem erweiterten Cologne-Score und der PD-L1 Färbeintensität verwendet. Für die Größe des Zusammenhangs wurde die Effektstärke nach Cohen berechnet und entsprechend der eben bereits beschriebenen Einteilung klassifiziert [111].

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Das Kollektiv

Das Kollektiv bestand aus 118 Fällen. Davon waren 108 Fälle männlich (92 %) und 10 weiblich (8 %). Von 70 Fällen mit Plattenepithelkarzinom des Larynx waren 66 männlich (94 %) und vier weiblich (6 %). Von 48 Fällen mit Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx waren 42 männlich (88 %) und 6 weiblich (13 %) (Abbildung 6).

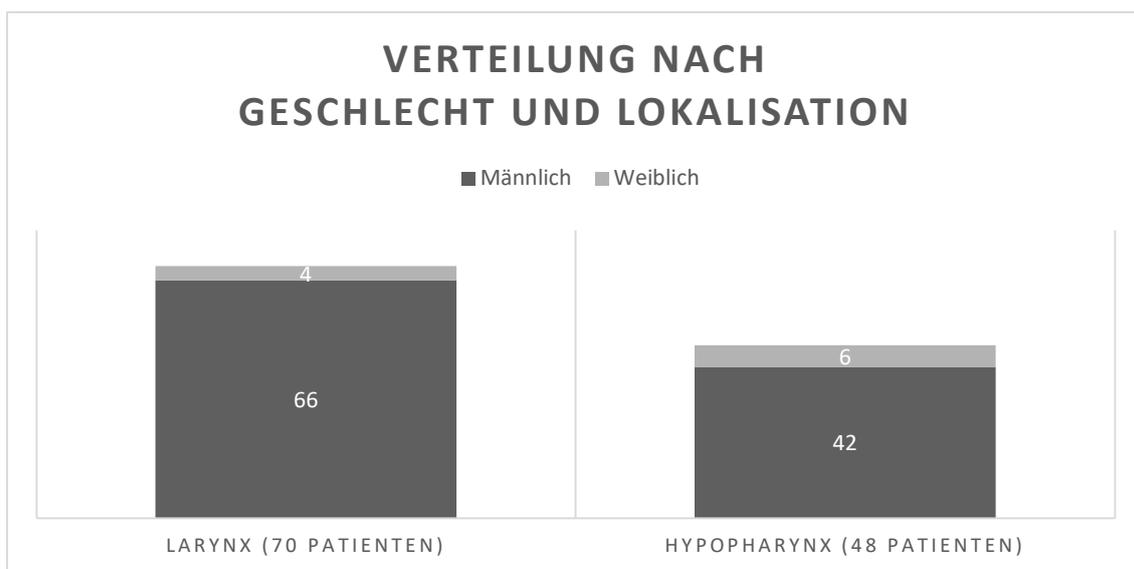


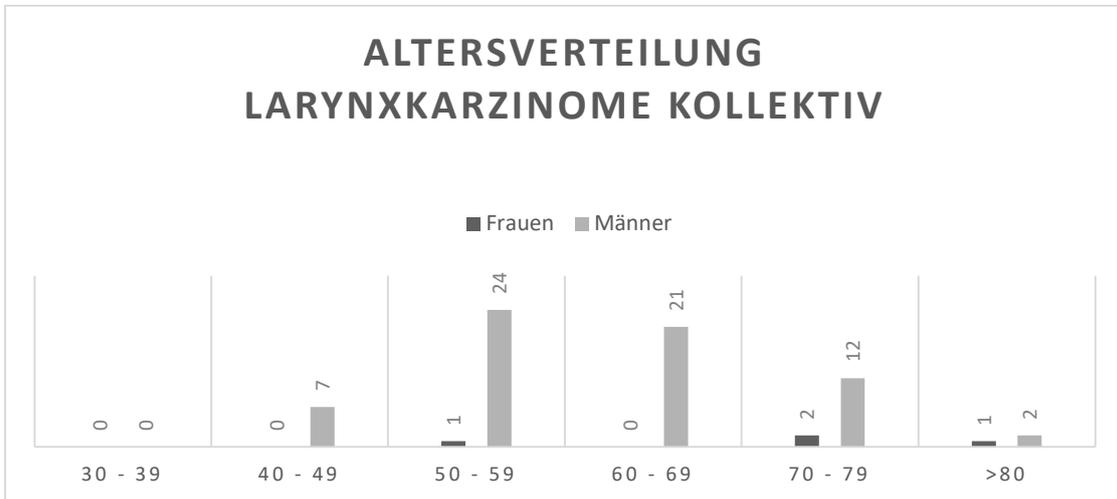
Abbildung 6: Verteilung des Gesamtkollektivs nach Geschlecht und Lokalisation in absoluten Zahlen

Die Altersspanne des gesamten Kollektivs erstreckte sich zwischen 38 und 85 Jahren. Das Medianalter lag bei 59, der Mittelwert bei 60 Jahren mit einer Standardabweichung von  $\pm 9$  Jahren.

Das Medianalter der Larynxkarzinomgruppe betrug 62 Jahre, der Mittelwert lag bei 62.2 Jahren mit einer Standardabweichung von  $\pm 9.4$  Jahren. Der jüngste Patient war 45 Jahre, der älteste Patient 85 Jahre alt. Das Medianalter der Hypopharynxkarzinomgruppe lag bei 57 Jahren, der Mittelwert lag bei 57.4 Jahren mit einer Standardabweichung von  $\pm 7.6$  Jahren. In dieser Gruppe war der jüngste Patient 38 und der älteste Patient 75 Jahre alt.

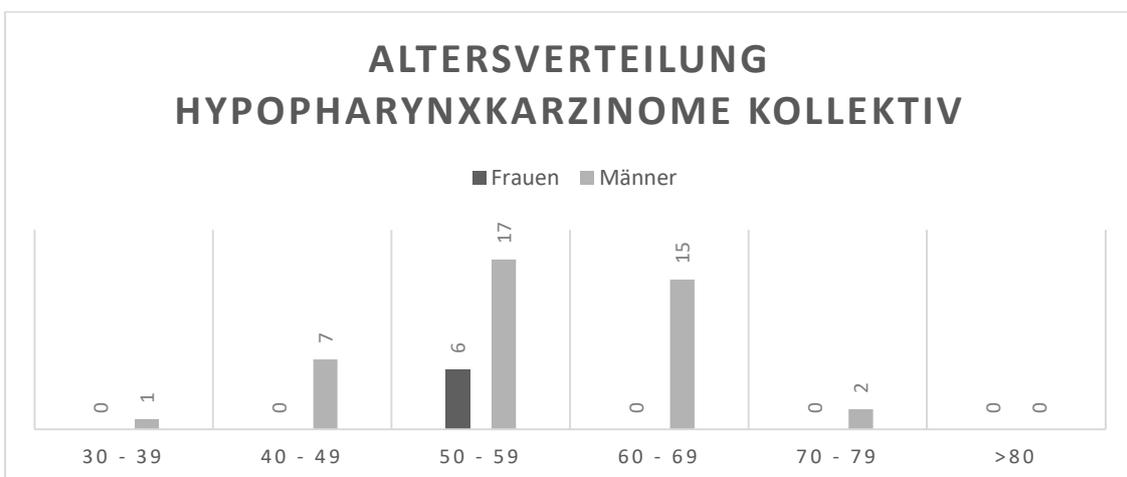
Das Erkrankungsalter wurde nach Lebensdekaden aufgeteilt. Hier zeigte sich das Maximum der Altersverteilung der Larynxkarzinomgruppe im Kollektiv bei 50-59 Jahren. In dieser Altersgruppe erkrankten insgesamt 25 Patienten (36 %) – darunter 24

männliche und 1 weibliche Patientin. 66 % des Kollektivs – 1 weiblicher und 45 männliche Patienten – waren von der Krebserkrankung betroffen, wenn der Betrachtungszeitraum um eine Dekade erweitert wurde (50-69 Jahre) (Abbildung 7).



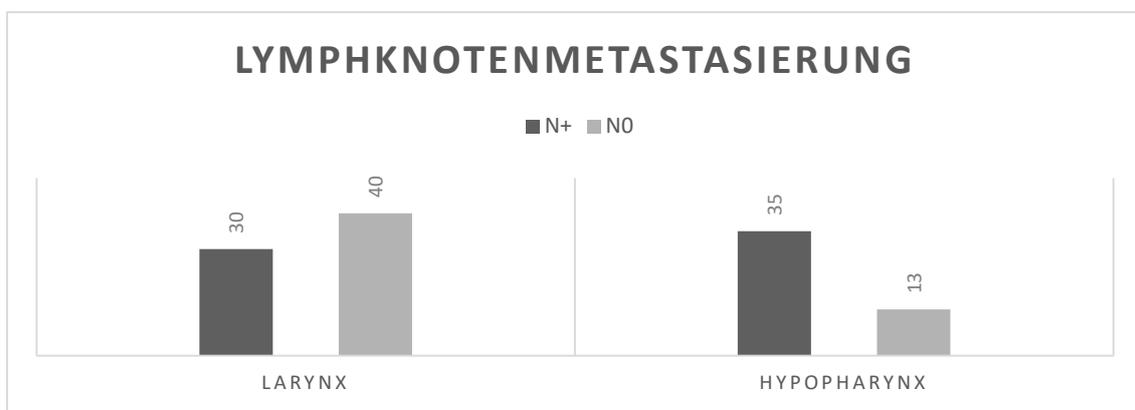
**Abbildung 7: Altersverteilung der Larynxkarzinompatienten des Kollektivs in absoluten Zahlen**  
Die untere Achse gibt das Alter in Jahren an.

Im Falle der Hypopharynxkarzinompatienten fiel ebenfalls eine quantitative Häufung in der Altersgruppe 50 – 59 Jahre auf. In diesem Alter erkrankten 23 (48 %) der 48 Fälle – davon waren 6 weiblich und 17 männlich. 38 Patienten (79 %) erkrankten – davon 6 weibliche und 32 männliche – bei Erweiterung des Betrachtungszeitraum um eine Lebensdekade (50 – 69 Jahre) (Abbildung 8).



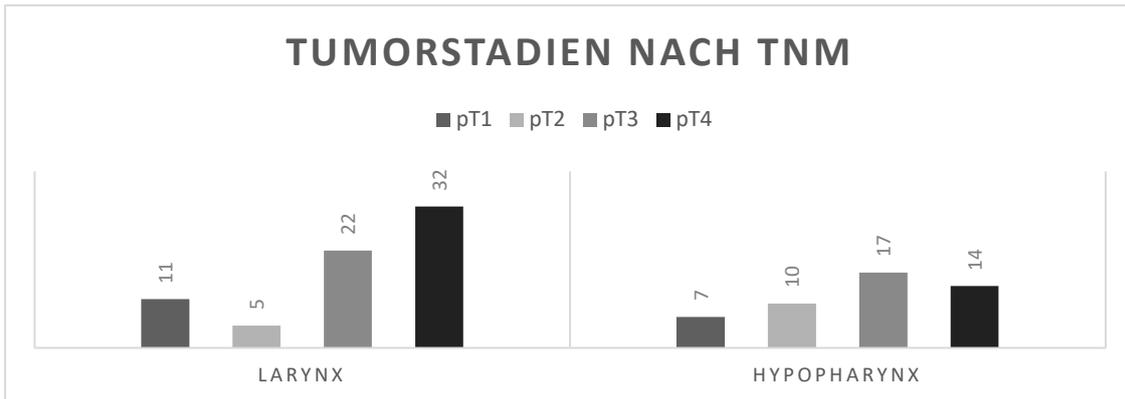
**Abbildung 8: Altersverteilung der Hypopharynxkarzinompatienten des Kollektivs in absoluten Zahlen**  
Die untere Achse gibt das Alter in Jahren an.

Bei Betrachtung der Lymphknoten zeigten 65 Fälle (55 %) des Gesamtkollektivs zum Zeitpunkt der Operation eine synchrone Lymphknotenmetastasierung und wurden als „N+“ klassifiziert. Dem gegenübergestellt konnte bei 53 Fällen (45 %) zum Zeitpunkt der Datenerfassung keine Lymphknotenmetastasierung nachgewiesen werden. Sie wurden als „N0“ bezeichnet. In der Larynxkarzinomgruppe wurden 30 Fälle (43 %) als N+ und 40 Fälle (57 %) als N0 klassifiziert. In der Gruppe der Hypopharynxkarzinome zeigten von 48 Fällen 35 (73 %) eine Lymphknotenmetastasierung, 13 (27 %) hingegen zeigten keine Lymphknoten-Metastasen (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Lymphknotenstatus des Gesamtkollektivs nach Lokalisation geordnet in absoluten Zahlen**

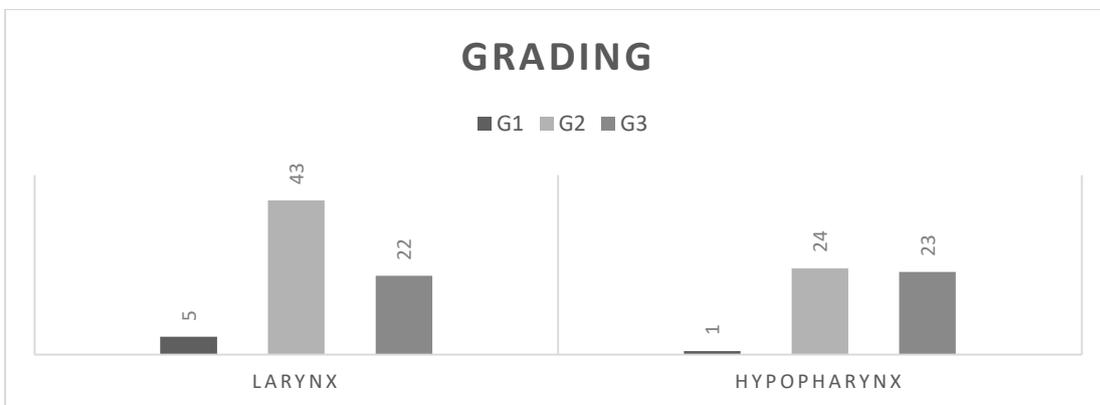
Bei Analyse der Tumorstadien gemäß TNM-Klassifikation konnten 11 (16 %) der 70 Larynxkarzinome der Kategorie pT1 zugeordnet werden. 5 Fälle (7 %) wurden als pT2, 22 Fälle (31 %) als pT3 und 32 Fälle (46 %) als pT4 klassifiziert. Im Vergleich dazu wurden die 48 Hypopharynxkarzinome wie folgt eingeordnet: 7 Fälle (15 %) wurden als Stadium pT1, 10 Fälle (21 %) als Stadium pT2, 17 Fälle (35 %) als Stadium pT3 und 14 Fälle (29 %) als Stadium pT4 eingestuft (Abbildung 10).



**Abbildung 10: pT-Status der Tumore des Gesamtkollektivs nach Lokalisation geordnet in absoluten Zahlen**

Hinsichtlich des Differenzierungsgrades zeigte sich, dass 61 % (43/70) der Larynxkarzinome mäßig differenziert (G2) waren. 5 Fälle (7 %) waren hoch differenziert (G1) und 22 Fälle (31 %) waren schlecht differenziert (G3).

In der Hypopharynxkarzinomgruppe präsentierte sich folgende Sachlage: Ein Tumor (2 %) war hochdifferenziert (G1), 24 Tumore (50 %) waren mäßig differenziert (G2) und 23 Tumore (48 %) waren schlecht differenziert (G3) (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Differenzierungsgrad (Grading) der Tumore des Gesamtkollektivs nach Lokalisation geordnet in absoluten Zahlen**

Im Rahmen der Analyse der Überlebenszeit zeigte sich, dass die Überlebensspanne im Gesamtkollektiv von 1 Monat bis 126 Monate reichte, der Median lag bei 32.5 Monaten, das arithmetische Mittel lag bei 42.1 Monaten mit einer Standardabweichung von  $\pm 35.6$  Monaten. Die Patienten wurden in drei Gruppen aufgeteilt: verstorbene Patienten, Patienten mit einem Überleben von über 5 Jahren und Patienten über deren Verbleib keine

näheren Informationen vorlagen – „last seen“ (hier wurden die Monate bis zur letzten Datenerfassung gezählt).

59 Patienten (50 %) waren in der Gruppe der verstorbenen Patienten. Von diesen waren 33 (56 %) an einem Larynxkarzinom und 26 (44 %) an einem Hypopharynxkarzinom erkrankt.

27 Patienten (23 %) überlebten > 5 Jahre, 17 (63 %) waren an einem Larynxkarzinom und 10 (37 %) an einem Hypopharynxkarzinom erkrankt.

In der letzten Gruppe „last seen“ befanden sich 32 Patienten (27 %). In dieser Gruppe erkrankten 20 Patienten (63 %) an einem Larynx- und 12 Patienten (38 %) an einem Hypopharynxkarzinom.

Im Falle der Larynxkarzinompatienten zeigte sich eine Überlebenszeit von 2 bis 126 Monaten, der Median betrug 30 Monate, das arithmetische Mittel lag bei 39,7 Monaten mit einer Standardabweichung von  $\pm 34,4$  Monaten.

In der Gruppe der Hypopharynxkarzinome reichte die Spannweite der Überlebenszeit von 1 Monat bis 124 Monate. Der Median lag bei 34,5 Monaten, das arithmetische Mittel bei 45,5 Monaten mit einer Standardabweichung von  $\pm 37$  Monaten.

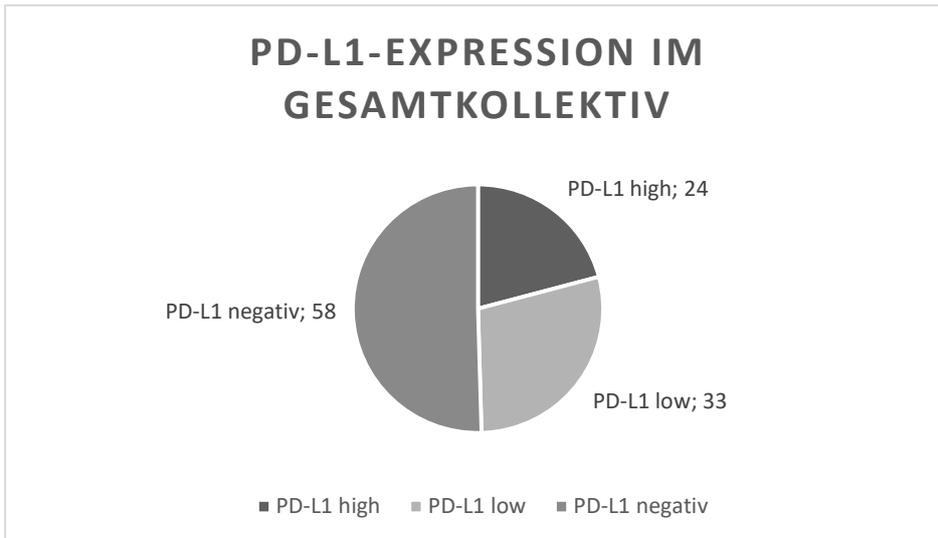
Die auf das gesamte Kollektiv berechnete absolute 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 50 % (eingeschlossen wurden alle Patienten, die sicher 61 Monate überlebten, bzw. vorher verstarben).

## **3.2 Markerexpression**

### **PD-L1**

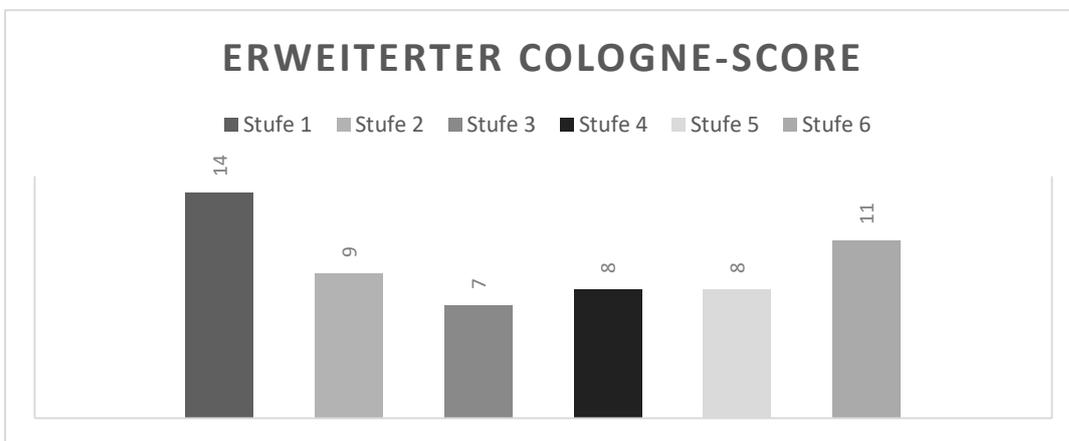
Bei der Auswertung der PD-L1-Expression fand sich in 57 der 118 Fälle (48 %) im Tumor eine Expression von PD-L1. Diese wurden als PD-L1+ bezeichnet. Von den PD-L1+ Fällen zeigten 24 (42 %) eine starke und 33 (58 %) eine schwache Färbung. Sie erhielten nachfolgend die Bezeichnungen PD-L1+ high bzw. PD-L1+h für eine starke Färbung und PD-L1+ low bzw. PD-L1+l für eine schwache Färbung.

Bei 58 Tumoren (49 %) konnte keine PD-L1 Färbereaktion nachgewiesen werden, sie wurden als PD-L1- graduiert (Abbildung 12). Bei 3 Tumoren (3 %) des Kollektivs war das Ergebnis nicht auswertbar.



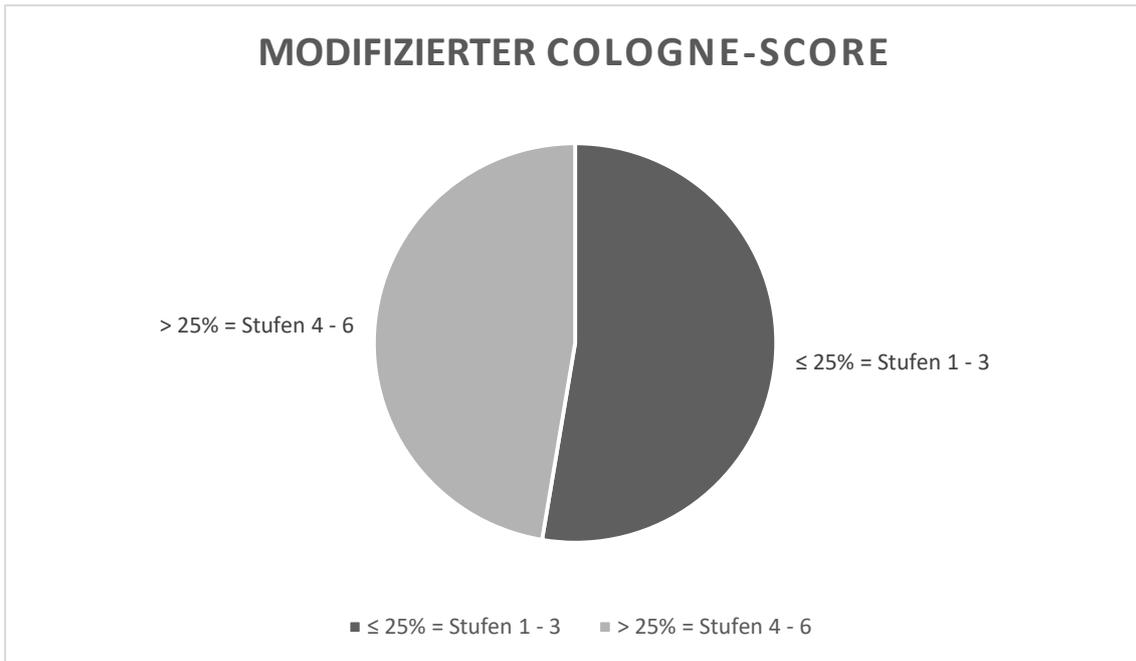
**Abbildung 12: Verteilung der PD-L1-Expression im Gesamtkollektiv**

Bei Betrachtung der 57 PD-L1+ Fälle im erweiterten Cologne-Score zeigte sich folgende Verteilung: 14 Fälle (25 %) konnten Stufe 1, 9 Fälle (16 %) konnten Stufe 2, 7 Fälle (12 %) konnten Stufe 3, 8 Fälle (14 %) konnten Stufe 4, 8 Fälle (14 %) konnten Stufe 5 und 11 Fälle (19 %) konnten Stufe 6 zugeordnet werden (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Verteilung der PD-L1+ Fälle in den 6 Stufen des erweiterten Cologne-Scores**  
 Stufe 1: 1-4 % PD-L1+ Zellen; Stufe 2: 5-9 % PD-L1+ Zellen; Stufe 3: 10-24 % PD-L1+ Zellen; Stufe 4: 25-49 % PD-L1+ Zellen; Stufe 5: 50-79 % PD-L1+ Zellen; Stufe 6: ≤ 80 % PD-L1+ Zellen.

Im modifizierten Cologne-Score wurden die Stufen 1-3 und 4-6 des erweiterten Cologne-Scores zusammengefasst. 27 Fälle (47 %) zeigten > 25 % PD-L1+ Zellen (Stufen 4-6), 30 Fälle (53 %) zeigten ≤ 25 % PD-L1+ Zellen (Stufen 1-3) (Abbildung 14).



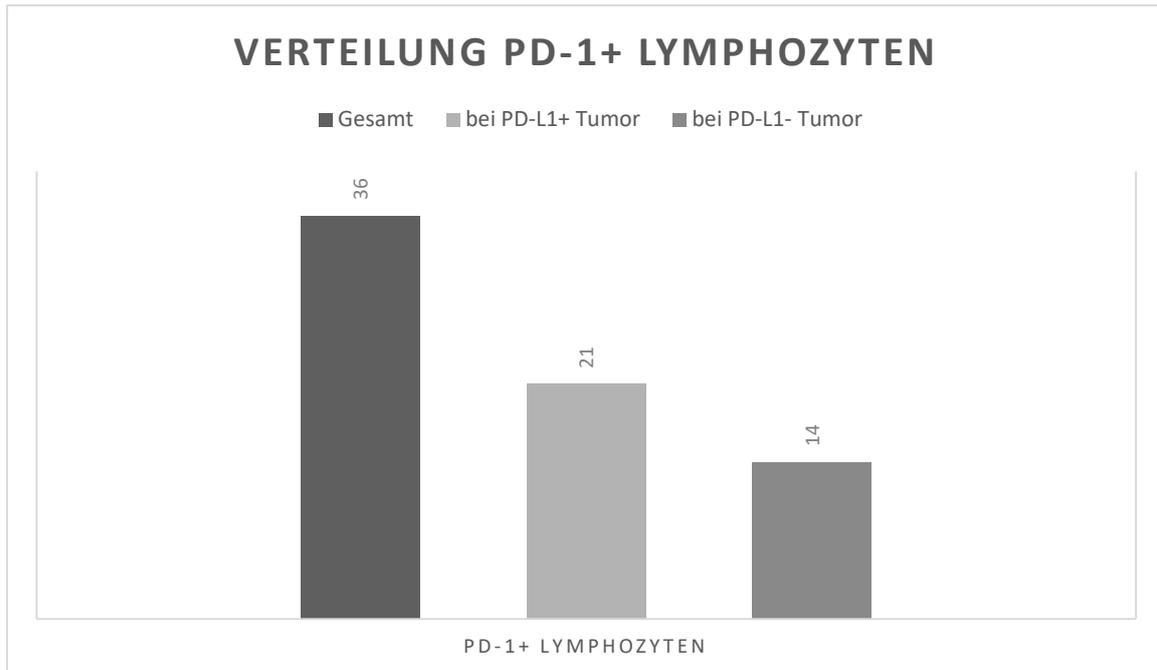
**Abbildung 14: Verteilung der PD-L1+ Fälle im modifizierten Cologne-Score**

### **PD-1**

Von den 118 Fällen des Gesamtkollektivs konnte bei 9 Fällen (8 %) in Assoziation zum Tumorverband innerhalb und benachbart PD-1+ Lymphozyten nachgewiesen werden. In 13 Fällen (11 %) fanden sich PD-1+ Lymphozyten ausschließlich benachbart zum Tumorzellverband. Bei 14 Fällen (12 %) kamen PD-1+ Lymphozyten nur innerhalb des Tumorverbands vor. In 80 Fällen (68 %) waren keine PD-1+ Lymphozyten vorhanden, diese galten dementsprechend als PD-1-.

Weiterhin war in 2 Fällen (2 %) das Ergebnis nicht auswertbar.

Insgesamt waren 36 Fälle PD-1+, davon waren 21 (58 %) PD-L1+ und 14 (39 %) PD-L1- (Abbildung 15). In 1 Fall (3 %) mit PD-1 positiven Lymphozyten war die Auswertung der PD-L1 Expression nicht möglich.



**Abbildung 15: Gesamtzahl und Verteilung der Patienten mit PD-1 positiven Lymphozyten in Abhängigkeit der PD-L1 Expression**

### **CD5**

In 38 von den 118 Fällen (32 %) des Gesamtkollektivs konnten CD5+ Lymphozyten innerhalb und benachbart zum Tumorzellverband nachgewiesen werden.

Bei 38 Fällen (32 %) waren CD5+ Lymphozyten lediglich benachbart des Tumorzellverbandes zu finden. CD5+ Lymphozyten, die sich nur innerhalb des Tumorverbandes lagen, konnten bei 24 Fällen (20 %) nachgewiesen werden. 17 Fälle (14 %) waren CD5- (Abbildung 16). In 1 Fall (1 %) war das Ergebnis nicht auswertbar.

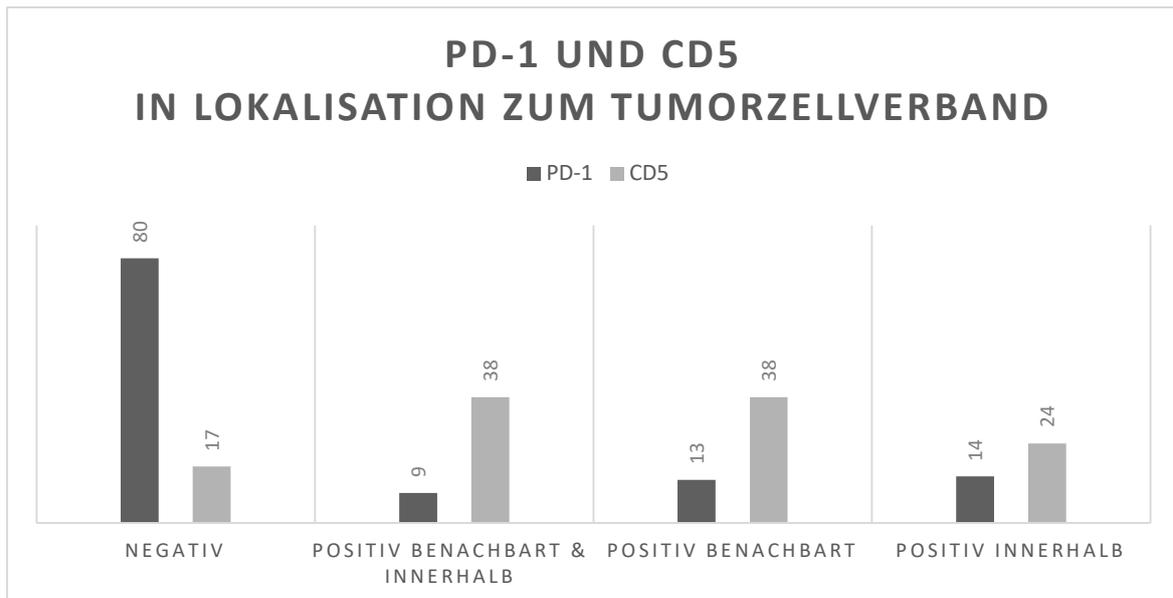


Abbildung 16: Expression von PD-1 und CD5 in Lokalisation zum Tumorzellverband

### 3.3 Prognostische Hinweise

#### PD-L1 und Geschlecht

Von den insgesamt 10 Fällen mit weiblichem Geschlecht waren 6 (60 %) PD-L1+ und 3 (30 %) PD-L1-. In einem Fall (10 %) war das Ergebnis nicht auswertbar.

In den Fällen mit männlichem Geschlecht zeigten von den 108 Fällen 51 (47 %) einen PD-L1+ und 55 (51 %) einen PD-L1- Tumor. 2 Färbungen (2 %) waren nicht auswertbar. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Geschlecht und dem Auftreten eines PD-L1+ Tumors ( $p = 0,32$ , exakter Test nach Fisher). Hierbei lag ein schwacher Effekt vor (Phi-Koeffizient:  $\phi = 0,1$ ).

Bei Betrachtung des mCologne-Scores fanden sich unter den 30 Fällen mit einer Anzahl von  $\leq 25$  % PD-L1+ Tumorzellen (Stufen 1-3) 25 Fälle (83 %) mit männlichem und 5 Fälle (17 %) mit weiblichem Geschlecht. Weiterhin zeigten 26 Fälle (96 %) mit männlichem Geschlecht und 1 Fall (4 %) mit weiblichem Geschlecht einen PD-L1+ Tumor mit  $> 25$  % PD-L1+ Tumorzellen (Stufen 4-6).

Auch bezüglich des mCologne-Scores und des Geschlechts zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,2$ , exakter Test nach Fisher). Es lag ein schwacher Effekt vor (Phi-Koeffizient:  $\phi = -0,21$ ).

### **PD-L1 und Sitz des Primärtumors**

Von den 70 Larynxkarzinomfällen zeigten 38 (54 %) einen PD-L1+ und 31 (44 %) einen PD-L1- Tumor. Ein Fall konnte nicht ausgewertet werden (1 %).

Von den 48 Hypopharynxkarzinomen waren 19 (40 %) PD-L1+ und 27 (56 %) PD-L1-. 2 Fälle (4 %) konnten nicht ausgewertet werden. Zwischen der Tumorlokalisation und dem PD-L1-Status ergab sich auch hier kein signifikanter Zusammenhang ( $\chi^2_{\text{Yates}} = 1,58$ ,  $p = 0,21$ ). Der Effekt war schwach (Phi-Koeffizient:  $\phi = -0,14$ ).

Weiterhin konnte bei Analyse des mCologne-Scores in Abhängigkeit des Sitzes des Primärtumors folgendes beobachtet werden: Von den insgesamt 30 Fällen mit  $\leq 25$  % PD-L1+ Tumorzellen (Stufen 1-3) zeigten 23 (77 %) ein Larynxkarzinom und 7 (23%) ein Hypopharynxkarzinom. Von den 27 Fällen mit  $> 25$  % PD-L1+ Tumorzellen (Stufen 4-6) lagen 15 Tumore (56 %) im Larynx und 12 Tumore (44 %) im Hypopharynx.

Darüber hinaus konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Tumore und des mCologne-Scores nachgewiesen werden ( $\chi^2_{\text{Yates}} = 2,0$ ,  $p = 0,16$ ). Es lag ein schwacher Effekt vor (Phi-Koeffizient:  $\phi = 0,22$ ).

### **PD-L1 und Erkrankungsalter**

Patienten mit einem PD-L1+ Tumor (M = 61,1 Jahre, SD =  $\pm 8,9$  Jahre, Md = 60 Jahre) erkrankten im Vergleich zu Patienten mit PD-L1- Tumoren (M = 59,4 Jahre, SD =  $\pm 9,2$  Jahre, Md = 59 Jahre) nicht signifikant häufiger in einem früheren oder späteren Lebensalter ( $t(113) = -0,97$ ,  $p = 0,33$ ). Die Effektstärke nach Cohen (1992) lag bei  $r = 0,09$  und entsprach damit einem schwachen Effekt.

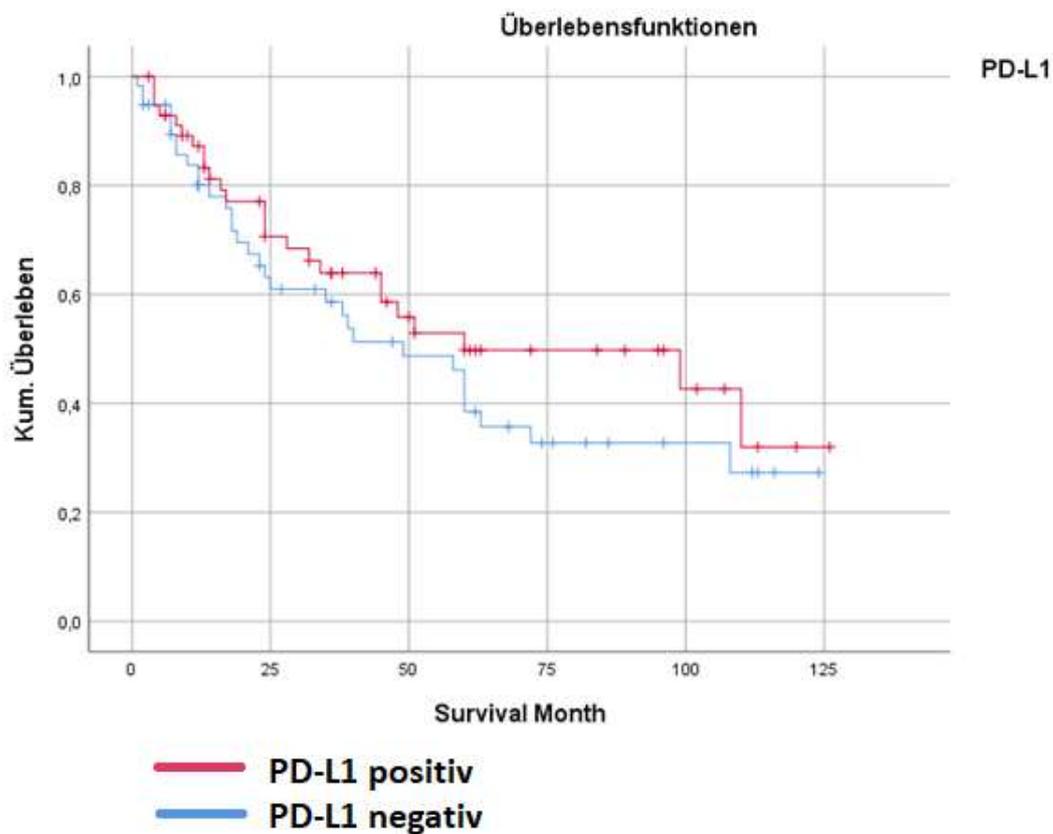
Die Altersspanne der PD-L1+ Patienten reichte von 38 – 85 Jahren. Bei den Patienten mit PD-L1- Tumoren reichte die Altersspanne von 44 – 80 Jahren.

Im Falle der prozentualen Anzahl der PD-L1+ Zellen, die sich in dem Stufen 1-3 ( $\leq 25$  % PD-L1+ Tumorzellen) (M = 61,9 Jahre, SD =  $\pm 10,5$  Jahre, Md = 61 Jahre, Altersspanne: 38 – 85 Jahre) und den Stufen 4-6 ( $> 25$  % PD-L1+ Tumorzellen) (M = 60,2 Jahre, SD =  $\pm 6,7$  Jahre, Md = 59 Jahre, Altersspanne: 49 – 76 Jahre) aufteilte, zeigte sich ebenso kein signifikanter Unterschied im Erkrankungsalter ( $t(55) = 0,76$ ,  $p = 0,45$ ). Hier war die Voraussetzung der Varianzhomogenität nicht gegeben, daher wurde der t-Test mit Welch-Korrektur bestimmt. Die Effektstärke nach Cohen (1992) entsprach mit  $r = 0,1$  einem schwachen Effekt.

### **PD-L1 und Überleben**

Von den 115 auswertbaren Patientenfällen des Kollektivs zeigten die 57 PD-L1+ Patienten ein durchschnittliches Überleben von 42,9 Monaten (SD = ± 35,1 Monate, Md = 34 Monate). Die Überlebensspanne reichte von 3 bis 126 Monate. Die 58 Patienten mit PD-L1- Tumoren zeigten ein durchschnittliches Überleben von 39,7 Monaten (SD = ± 35,4 Monate, Md = 24 Monate). Hier betrug die kleinste Überlebensdauer ein Monat und die längste 124 Monate.

In der weiteren Untersuchung wurde die Überlebensrate nach Kaplan und Meier betrachtet. Dabei zeigten sich ähnliche Überlebenswahrscheinlichkeiten bis etwa 60 Monate nach Erstdiagnose. Nach dem 60. Monat zeigte sich eine etwas bessere Überlebenswahrscheinlichkeit für die Patienten mit PD-L1+ Tumor. Nach circa 110 Monaten glichen sich die Kurven wieder an. Patienten mit einem PD-L1+ Tumor zeigten etwa 60 Monate nach Erstdiagnose eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 50 %, Patienten mit einem PD-L1- Tumor zeigten schon nach 49 Monaten eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 50 % (Abbildung 17). Jedoch konnte weiterhin kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Überlebenskurven nachgewiesen werden ( $p = 0,28$ , Log-Rank-Test).

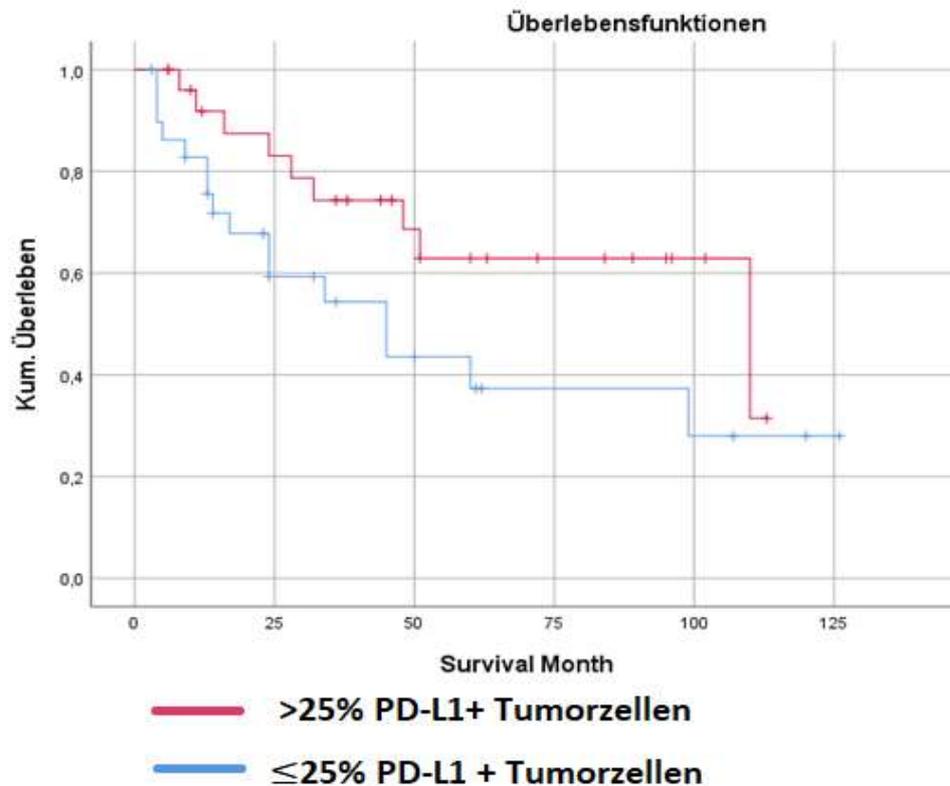


**Abbildung 17: Vergleich der Überlebenskurven in Abhängigkeit des PD-L1-Status in Monaten**

In der waagerechten Achse wird das Überleben in Monaten dargestellt. Die senkrechte Achse zeigt das prozentuale kumulative Überleben in Dezimalzahlen. Die senkrechten Striche symbolisieren Zensierungen – diese geben das Überleben bis zum letzten dokumentierten Zeitpunkt an.

Bei Betrachtung der prozentualen Anzahl der PD-L1+ Tumorzellen überlebten Patienten mit  $\leq 25$  % PD-L1+ Zellen im Durchschnitt 36,5 Monate (SD =  $\pm 34.89$  Monate, Md = 24 Monate). Die kürzeste Überlebensdauer betrug 3 Monate, die längste Überlebensdauer lag bei 126 Monaten. Dem gegenübergestellt überlebten Patienten mit  $> 25$  % im Durchschnitt 50 Monate (SD =  $\pm 33.92$  Monate, Md = 46 Monate). Die kürzeste Überlebensdauer lag bei 6 Monaten, die längste betrug 113 Monate.

In der Überlebenskurve nach Kaplan und Meier zeigte sich eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit  $> 25$  % PD-L1+ Zellen. Patienten mit  $> 25$  % PD-L1+ Zellen zeigten etwa 110 Monate nach Erstdiagnose eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 50 %, Patienten mit  $\leq 25$  % PD-L1+ Zellen zeigten diese dagegen bereits nach 45 Monaten (Abbildung 18). Diese Beobachtung war nicht signifikant ( $p = 0,08$ , Log-Rank-Test).



**Abbildung 18: Vergleich der Überlebenskurven in Abhängigkeit der prozentualen Anzahl PD-L1+ Zellen in Monaten**

In der waagerechten Achse wird das Überleben in Monaten dargestellt. Die senkrechte Achse zeigt das prozentuale kumulative Überleben in Dezimalzahlen. Die senkrechten Striche symbolisieren Zensurierungen – diese geben das Überleben bis zum letzten dokumentierten Zeitpunkt an.

### PD-L1 und das Erkrankungsstadium

Die 57 Fälle in der Gruppe der PD-L1+ Tumore teilten sich gemäß des Erkrankungsstadiums wie folgt auf:

- 6 Fälle (11 %) zeigten das Stadium pT1
- 13 Fälle (23 %) zeigten das Stadium pT2
- 16 Fälle (28 %) zeigten das Stadium pT3
- 22 Fälle (39 %) zeigten das Stadium pT4

Die 58 Fälle der PD-L1- Tumore zeigte dem gegenübergestellt folgende Aufteilung bezogen auf das Erkrankungsstadium:

- 10 Fälle (17 %) zeigten das Stadium pT1
- 2 Fälle (3 %) zeigten das Stadium pT2
- 23 Fälle (40 %) zeigten das Stadium pT3
- 23 Fälle (40 %) zeigten das Stadium pT4

Es zeigte sich zwischen dem PD-L1-Status und dem pT-Stadium ein signifikanter Zusammenhang ( $\chi^2(3) = 10,3$ ,  $p = 0,02$ ). Es lag ein starker Effekt vor (Cramer-V:  $V = 0,3$ ).

Metastasierte Lymphknoten wiesen 29 (51 %) der 57 PD-L1+ Fälle auf. 28 Fälle (49 %) mit PD-L1+ Tumor zeigten hingegen keine Lymphknotenmetastasierung.

Von den PD-L1- Fällen waren 23 Fälle (40 %) mit metastasenfremen und 35 Fälle (60 %) mit metastasierten Lymphknoten. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen PD-L1+ bzw. PD-L1- Tumoren und der Lymphknotenmetastasierung ( $\chi^2_{\text{Yates}} = 0,7$ ,  $p = 0,4$ ). Die Effektstärke beschrieb einen schwachen Effekt (Phi-Koeffizient:  $\phi = -0,1$ ).

Im Bezug auf die prozentuale Anzahl der PD-L1+ Tumorzellen zeigte sich gemäß der Einteilung nach dem Erkrankungsstadien folgende Verteilung:

30 Fälle mit  $\leq 25\%$  PD-L1+ Zellen:

- 3 Fälle (10 %) zeigten das Stadium pT1
- 6 Fälle (20 %) zeigten das Stadium pT2
- 8 Fälle (27 %) zeigten das Stadium pT3
- 13 Fälle (43 %) zeigten das Stadium pT4

Davon waren 16 Fälle (53 %) mit Lymphknotenmetastasierung und 14 Fälle (47 %) ohne Lymphknotenmetastasierung.

27 Fälle mit  $> 25\%$  PD-L1+ Zellen:

- 3 Fälle (11 %) zeigten das Stadium pT1
- 7 Fälle (26 %) zeigten das Stadium pT2
- 8 Fälle (30 %) zeigten das Stadium pT3
- 9 Fälle (33 %) zeigten das Stadium pT4

Von diesen waren 13 Fällen (48 %) mit metastasierten Lymphknoten und 14 Fälle (52 %) ohne metastasierte Lymphknoten.

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem pT-Stadium und der prozentualen Anzahl der PD-L1+ Tumorzellen ( $\chi^2(3) = 0,65$ ,  $p = 0,89$ ). Es lag ein schwacher Effekt vor (Cramer-V:  $V = 0,11$ ). Hierbei ist zu beachten, dass bei 25 % der Zellen eine erwartete Häufigkeit  $< 5$  vorlag.

Darüber hinaus ergab sich ebenso kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der PD-L1+ Tumorzellen und der Lymphknotenmetastasierung ( $p = 0,79$ , exakter Test nach Fisher). Die Effektstärke beschrieb einen schwachen Effekt (Phi-Koeffizient:  $\phi = -0,05$ ).

### **PD-L1 und Grading**

Bei Betrachtung des Gradings zeigte sich für die 57 PD-L1+ Fälle folgende Einteilung:

- 4 Fälle (7 %) zeigten den Differenzierungsgrad G1
- 32 Fälle (56 %) zeigten den Differenzierungsgrad G2
- 21 Fälle (37 %) zeigten den Differenzierungsgrad G3

Dem Gegenübergestellt teilte sich der Differenzierungsgrad für die 58 PD-L1- Fälle wie folgt auf:

- 2 Fälle (3 %) zeigten den Differenzierungsgrad G1
- 33 Fälle (57 %) zeigten den Differenzierungsgrad G2
- 23 Fälle (40 %) zeigten den Differenzierungsgrad G3

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grading und dem PD-L1 Status nachgewiesen werden ( $\chi^2(2) = 0,76$ ,  $p = 0,68$ ). Es handelte sich um einen schwachen Effekt (Cramer-V:  $V = .08$ ). Hierbei lag bei 33 % der Zellen die erwartete Zellhäufigkeit unter 5.

Weiterhin wurde auch ein möglicher Zusammenhang zwischen der prozentualen Anzahl der PD-L1+ Tumorzellen und dem Grading untersucht, dabei zeigte sich folgende Aufteilung:

30 Fälle mit  $\leq 25$  % PD-L1+ Zellen:

- 2 Fälle (7 %) zeigten den Differenzierungsgrad G1
- 17 Fälle (57 %) zeigten den Differenzierungsgrad G2
- 11 Fälle (37 %) zeigten den Differenzierungsgrad G3

27 Fälle mit  $> 25$  % PD-L1+ Zellen:

- 2 Fälle (7%) zeigten den Differenzierungsgrad G1
- 15 Fälle (56 %) zeigten den Differenzierungsgrad G2
- 10 Fälle (37 %) zeigten den Differenzierungsgrad G3

Zwischen der prozentualen Anzahl der PD-L1+ Zellen und dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen lag kein signifikanter Zusammenhang vor ( $\chi^2(2) = 0,02$ ,  $p = 0,99$ ). Die Effektstärke war schwach (Cramer-V:  $V = 0,02$ ). Es ist zu beachten, dass 33 % der Zellen eine erwartete Zellhäufigkeit unter 5 aufwiesen.

### **PD-L1-Färbeintensität und Cologne-Score**

Bei der Untersuchung auf einen Zusammenhang zwischen der Färbeintensität der PD-L1+ Zellen („high“ vs. „low“) und dem modifizierten Cologne-Score ( $\leq 25$  % vs.  $> 25$  %) konnte folgende Verteilung beobachtet werden:

33 Fälle zeigten eine PD-L1 Färbung mit einer niedrigen Intensität („low“), davon hatten 21 Fälle (64 %) eine prozentuale Anzahl  $\leq 25$  % und 12 Fälle (36 %) eine prozentuale Anzahl von  $> 25$  %.

24 Fälle wiesen eine PD-L1 Färbung mit starker Intensität auf („high“), davon zeigten 9 Fälle (38 %) eine prozentuale Anzahl  $\leq 25$  % und 15 Fälle (63 %) eine prozentuale Anzahl von  $> 25$  %.

Es lag kein signifikanter Zusammenhang vor ( $\chi^2_{\text{Yates}} = 2,83$ ,  $p = 0,09$ ). Dabei zeigte sich eine mittlere Effektstärke (Phi-Koeffizient:  $\phi = .26$ ).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in den nachstehenden Tabellen (Tabelle 7 und Tabelle 8).

**Tabelle 7: Statistischer und numerischer Vergleich der PD-L1 Expression gegenüber den verschiedenen Variablen des Kollektivs**

Drei Fälle konnten nicht ausgewertet werden. Signifikante Ergebnisse werden mit einem „\*“ markiert. Chi<sup>2</sup>-Unabhängigkeitstests, bei denen Zellen eine erwartete Häufigkeit <5 aufwiesen, wurden mit einem „+“ markiert.

	<b>PD-L1+</b>	<b>PD-L1-</b>	<b>Statistische Tests</b>
<b>Absolute Anzahl (%)</b>	57 (48,3 %)	58 (49,2 %)	
<b>Geschlecht (%)</b>			
M	51 (89,5 %)	55 (94,8 %)	p = 0,32 exakter Test nach Fisher
W	6 (10,5 %)	3 (5,2 %)	
<b>Lokalisation (%)</b>			
Larynx	38 (66,7 %)	31 (53,4 %)	$\chi^2_{\text{Yates}} = 1,58$ p = 0,21
Hypopharynx	19 (33,3 %)	27 (46,6 %)	
<b>Erkrankungsalter (in Jahren)</b>			
Medianes	60	59	t(113) = -0,97 p = 0,33
Erkrankungsalter	61,09	59,43	
Mittleres Erkrankungsalter	± 8,92	± 9,2	
Standardabweichung	38 - 85	44 - 80	
Altersspanne			
<b>Überleben (in Monaten)</b>			
Medianes Überleben	34	24,5	p = 0,28 Log-Rank-Test
Mittleres Überleben	42,89	39,69	
Standardabweichung	± 35,1	± 35,37	
Überlebensspanne	3 - 126	1 - 124	
<b>TNM-Klassifikation (%)</b>			
pT1	6 (10,5 %)	10 (17,2 %)	$\chi^2(3) = 10,3$ p = 0,02*
pT2	13 (22,8 %)	2 (3,4 %)	
pT3	16 (28,1 %)	23 (39,7 %)	
pT4	22 (38,6 %)	23 (39,7 %)	
N0	28 (49,1 %)	23 (39,7 %)	$\chi^2_{\text{Yates}} = 0,7$ p = 0,4
N+	29 (50,9 %)	35 (60,3 %)	

<b>Grading (%)</b>			
G1	4 (7,0 %)	2 (3,4 %)	$\chi^2(2) = 0,76$ p = 0,68 <sup>+</sup>
G2	32 (56,1 %)	33 (56,9 %)	
G3	21 (36,8 %)	23 (39,7 %)	

**Tabelle 8: Statistischer und numerischer Vergleich der prozentualen Anzahl PD-L1+ Zellen gegenüber den verschiedenen Variablen des Kollektivs**

Drei Fälle konnten nicht ausgewertet werden. Signifikante Ergebnisse werden mit einem „\*“ markiert. Chi<sup>2</sup>-Unabhängigkeitstests, bei denen Zellen eine erwartete Häufigkeit <5 aufwiesen, wurden mit einem „+“ markiert.

	<b>mCologne-Score ≤ 25 %</b>	<b>mCologne-Score &gt; 25 %</b>	<b>Statistische Tests</b>
<b>Absolute Anzahl (%)</b>	30	27	
<b>Geschlecht (%)</b>			
M	25 (83,3 %)	26 (96,3 %)	p = 0,2 exakter Test nach Fisher
W	5 (16,7 %)	1 (3,7 %)	
<b>Lokalisation (%)</b>			
Larynx	23 (76,7 %)	15 (55,6 %)	$\chi^2_{\text{Yates}} = 2,0$ p = 0,16
Hypopharynx	7 (23,3 %)	12 (44,4 %)	
<b>Erkrankungsalter (in Jahren)</b>			
Medianes	61	59	t(55) = 0,76 p = 0,45
Erkrankungsalter	61,93	60,15	
Mittleres Erkrankungsalter	±10,45	±6,71	
Standardabweichung	38 - 85	49 - 76	
<b>Überleben (in Monaten)</b>			
Medianes Überleben	24	46	p = 0,08 Log-Rank-Test
Mittleres Überleben	36,47	50,04	
Standardabweichung	±34,89	±33,92	
Überlebensspanne	3 - 126	6 - 113	
<b>TNM-Klassifikation (%)</b>			
pT1	3 (10 %)	3 (11,1 %)	$\chi^2(3) = 0,65$

pT2	6 (20 %)	7 (25,9 %)	p = 0,89 <sup>+</sup>
pT3	8 (26,7 %)	8 (29,6 %)	
pT4	13 (43,3 %)	9 (33,3 %)	
N0	14 (46,7 %)	14 (51,9 %)	p= 0,79 exakter Test nach Fisher
N+	16 (53,3 %)	13 (48,1 %)	
<b>Grading (%)</b>			
G1	2 (6,7 %)	2 (7,4 %)	$\chi^2(2) = 0,02$ p = 0,99 <sup>+</sup>
G2	17 (56,7 %)	15 (55,6 %)	
G3	11 (36,7 %)	10 (37 %)	
<b>Färbeintensität</b>			
Low	21 (70 %)	12 (44,4 %)	$\chi^2_{\text{Yates}} = 2,83$ p = 0,09
High	9 (30 %)	15 (55,6 %)	

### 3.4 Zusammenhang zwischen den Markerexpressionen

Im Rahmen der Analyse nach möglichen Zusammenhängen zwischen der Expression von PD-1, PD-L1 und CD5 fielen signifikante Korrelationen auf.

Zwischen dem erweiterten Cologne-Score und der ausgewerteten semiquantitativen Menge von CD5+ Lymphozyten innerhalb des Tumorverbandes zeigte sich eine signifikante positive Korrelation ( $r_s = 0,4$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 56$ ). Dies entsprach einem mittleren Effekt (Effektstärke nach Cohen (1992)).

Die Korrelation zwischen dem erweiterten Cologne-Score und der Menge der PD-1+ Lymphozyten innerhalb und benachbart des Tumorverbandes und der Menge der CD5+ Lymphozyten benachbart des Tumorverbandes ergab keinen signifikanten Zusammenhang (Tabellen 9 und 10).

**Tabelle 9: Korrelation nach Spearman zwischen dem erweiterten Cologne-Score und der Expression von CD5+i und CD5+p**

			erweiterter Cologne- Score	CD5+p	CD5+i
Spearman- Korrelation	erweiterter Cologne- Score	Korrelationskoeffizient	1,000	0,09	0,4
		Signifikanz (2-seitig)		0,51	<0,01
		n	57	56	56

**Tabelle 10: Korrelation nach Spearman zwischen dem erweiterten Cologne-Score und der Expression von PD-1+i und PD-1+p**

			erweiterter Cologne- Score	PD-1+p	PD-1+i
Spearman- Korrelation	erweiterter Cologne- Score	Korrelationskoeffizient	1,00	0,22	0,07
		Signifikanz (2-seitig)		0,1	0,6
		n	57	57	57

Weiterhin konnten auch Korrelationen zwischen der Färbeintensität der PD-L1+ Zellen und den anderen Markern aufgezeigt werden. So zeigte die Färbeintensität der PD-L1+ bzw. PD-L1- Zellen (PD-L1-, PD-L1+l, PD-L1+h) und die Anzahl der PD-1+ Zellen ( $r_s = 0,2$ ,  $p = 0,04$ ,  $n = 114$ , schwache Effektstärke nach Cohen (1992)) und CD5+ Zellen ( $r_s = 0,35$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 114$ , mittlere Effektstärke nach Cohen (1992)) innerhalb des Tumorverbands eine positive signifikante Korrelation (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Korrelation nach Spearman zwischen der PD-L1 Färbeintensität und der Expression von CD5+i und PD-1+i**

		Färbeintensität	PD-1+i	CD5+i
Spearman- Korrelation	Korrelationskoeffizient	1,00	0,2	0,35
	Signifikanz (2-seitig)		0,04	<0,01
	n	115	114	114

Auch CD5 und PD-1 zeigten zueinander Korrelationen.

So fiel zwischen der semiquantitativen Menge der CD5+ Zellen und der semiquantitativen Menge der PD-1+ Zellen innerhalb des Tumorverbands eine positive signifikante Korrelation auf ( $r_s = 0,27$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 115$ , schwacher Effekt nach Cohen (1992)). Auch zwischen der Menge der CD5+ Zellen und der Anzahl der PD-1+ Zellen benachbart des Tumorverbands lag eine positive signifikante Korrelation vor ( $r_s = 0,40$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 115$ , mittlere Effektstärke nach Cohen (1992)).

Weiterhin zeigten auch die Menge der CD5+ Zellen benachbart des Tumorverbands und die Menge der PD-1+ Zellen innerhalb des Tumorverbands eine positive signifikante Korrelation zueinander ( $r_s = 0,24$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 115$ , schwacher Effekt nach Cohen (1992)) (Tabellen 12 und 13).

**Tabelle 12: Korrelation nach Spearman zwischen CD5+p und PD-1+p und PD-1+i**

			CD5+p	CD5+i	PD-1+p	PD-1+i
Spearman-Korrelation	CD5+p	Korrelationskoeffizient	1,00	0,05	0,4	0,24
		Signifikanz (2-seitig)		0,61	<0,01	<0,01
		n	117	117	115	115

**Tabelle 13: Korrelation nach Spearman zwischen CD5+i und CD5+p, PD-1+p und PD-1+i**

			CD5+i	CD5+p	PD-1+p	PD-1+i
Spearman-Korrelation	CD5+i	Korrelationskoeffizient	1,00	0,05	0,05	0,27
		Signifikanz (2-seitig)		0,61	0,61	<0,01
		n	117	117	115	115

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Nachweis von PD-L1 und PD-1**

#### **PD-L1**

Es konnte gezeigt werden, dass nahezu die Hälfte der Fälle (57 Fälle, 48 %) eine PD-L1+ Färbung aufwiesen. Bei Betrachtung des modifizierten Cologne-Scores zeigte sich weiterhin, dass in 30 (53 %) der 57 PD-L1+ Fälle  $\leq 25$  % der Tumorzellen angefärbt wurden, in den anderen 27 (47 %) PD-L1+ Fällen wurden  $> 25$  % der Tumorzellen angefärbt.

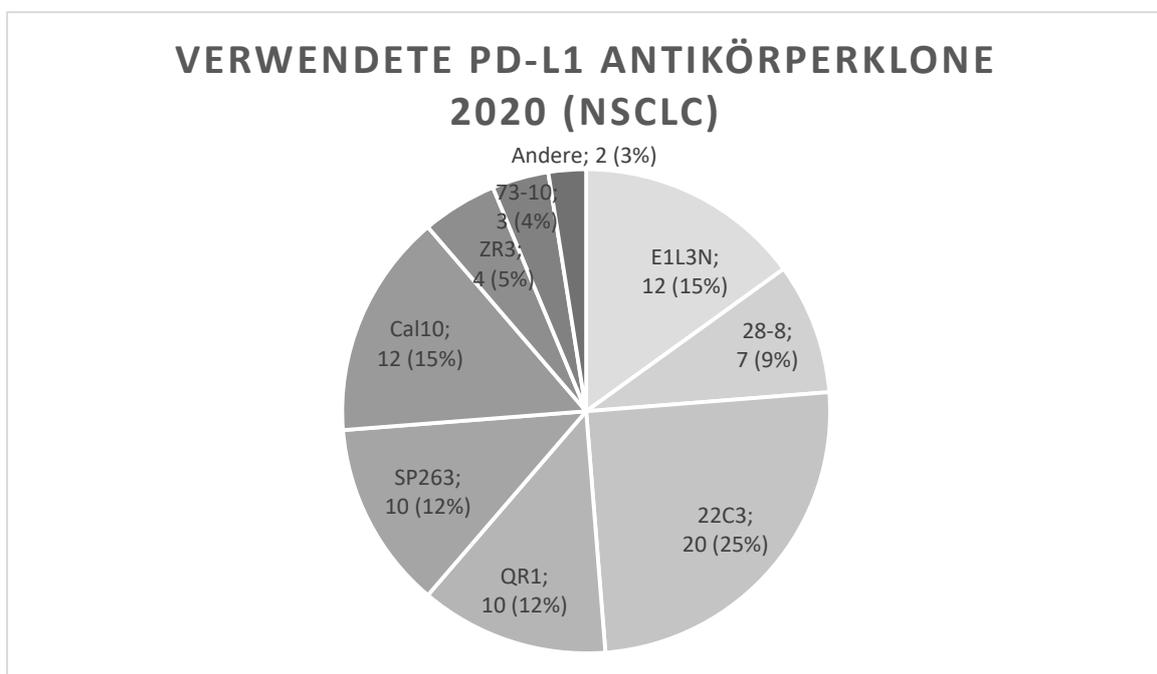
Wie in der Einleitung unter 1.3.1 – Datenlage zu PD-L1 und PD-1 in Larynx- und Hypopharynxkarzinomen – bereits beschrieben, stellt sich in der Literatur eine breite Expressionsspannweite von PD-L1+ in HNSCC dar. So konnten Straub et al. in Karzinomen der Mundhöhle ähnlich zu den Ergebnissen des Kollektivs eine Expression von PD-L1 36 (45 %) von 80 Fällen nachweisen [86]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten alle 69 eingeschlossenen Larynxkarzinomfälle in der Studie von Yu et al. eine PD-L1+ Expression [87]. Burtness et al. hingegen orientierten sich am CPS und beobachteten in 85 % (754/882) der Fälle einen CPS  $\geq 1$  [82]. Die Vergleichbarkeit all dieser Arbeiten ist jedoch durch die unterschiedliche Methodik limitiert. So ist zu beachten, dass Straub et al. erst ab einem Anteil von mindestens 5 % angefärbten Tumorzellen eine Färbung als PD-L1+ werteten, wohingegen in dieser Arbeit der Cut-Off-Wert bei  $\geq 1$  % lag [86]. Bei identischen Auswertungskriterien von  $\geq 5$  % hätten lediglich 43 (36 %) Fälle der ursprünglich 57 Kollektivfälle eine PD-L1+-Färbung gezeigt.

Im Falle der Studie von Yu et al. lag der Cut-Off der Expressionsrate bei  $\geq 6$  %. Weiterhin sind die Angaben bezüglich des verwendeten PD-L1-Klons lückenhaft [87].

Es bleibt also fraglich, wie sich dieser deutliche Ergebnisunterschied insgesamt interpretieren lässt.

Ein möglicher Erklärungsansatz liegt neben den differenten Cut-Off-Werten (Tabelle 2) in der Vielzahl an verwendeten und auf dem Markt erhältlichen PD-L1-Antikörperklonen (Abbildung 19). Scheel et al. konnten diesbezüglich zeigen, dass bei der IHC-Untersuchung von Lungenkarzinomen mit diversen PD-L1-Antikörperklonen Unterschiede im Färbeverhältnis und der Färbeintensität der Karzinomzellen sowie der tumorassoziierten Immunzellen vorlagen [105].

Zur Behebung dieses Problems führt die Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie, QuIP-GmbH (QuIP), seit mehreren Jahren Ringversuche durch, um die Auswertung der Färbungen zu vereinheitlichen und zu erleichtern. Bei einem Ringversuch handelt es sich um ein Verfahren der externen Qualitätssicherung in der Pathologie, um eine Vergleichbarkeit bzw. eine generelle Diagnosegenauigkeit der teilnehmenden Praxen oder Institute zu schaffen [112]. In der von der QuIP noch nicht endgültig publizierten Harmonisierungsstudie zu HNSCC zeigen sich übereinstimmend zu Scheel et al. Unterschiede im Färbecharakter verschiedener Antikörperklone [113].



**Abbildung 19: Verwendete Antikörper des QuIP aus dem Jahr 2020**

Abgebildet sind die von den Teilnehmern des QuIP verwendeten PD-L1-Antikörperklone aus dem Jahr 2020 mit absoluten Werten und prozentualen Anteilen. Alle verwendeten Antikörper wurden für Färbungen am NSCLC verwendet.

(Eigene Darstellung, Daten aus PD-L1 Portal (QuiP) [114])

Neben den eingesetzten Klonen sind auch die Prozesse zu berücksichtigen, die relevant für die IHC-Färbung und die anschließende Auswertung sind. Dabei können Fehler z.B. in der Fixierung oder innerhalb des Einbettprozesses zu falsch interpretierten Ergebnissen führen [115]. Bedacht werden sollte weiterhin, dass die Auswertung durch einen Untersucher und nicht durch ein computergesteuertes Programm erfolgte. Damit fehlt zum einen die Sicherheit durch die Kontrolle eines zweiten Untersuchers, zum anderen besteht die Möglichkeit auf unbewusste Subjektivität, die zu Verzerrungen oder Störungen im Ergebnis führen kann. Das Auftreten von Hornperlen, Hornlamellen und

Desmosomen kann zusätzlich die Auswertung auch für erfahrene Pathologen erschweren [113]. Diese Theorie wird auch beim Vergleich des erweiterten Colone-Scores mit der Färbeintensität untermauert. Hier zeigt sich ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Färbeintensität und Anzahl der angefärbten PD-L1+ Zellen. So könnte eine intensivere Färbung den Eindruck von prozentual mehr gefärbten Zellen erwecken als eine vergleichbare schwächere Färbung. Zwar ist der Zusammenhang nicht signifikant ( $\chi^2_{\text{Yates}} = 2,83$ ,  $p = 0,09$ ), trotzdem sollte die Beeinflussung der Auswertung durch den Untersucher nicht außer Acht gelassen werden.

Auch der Einfluss von Toxinen wie Nikotin oder Alkohol muss berücksichtigt werden. Obwohl die Einwirkung von Umweltkarzinogenen im Hinblick auf die PD-L1 Expression noch nicht vollständig verstanden ist, konnten Studien zeigen, dass Raucher und ehemalige Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren zeigten [116, 117]. Da das Kollektiv bereits einige Jahre vorbestand, ist in der vorliegenden Arbeit eine Erhebung dieser Daten leider nicht mehr möglich und wahrscheinlich auch nicht erfolgversprechend, da keine Normalverteilung von Rauchern und Nichtrauchern im Kollektiv erwartet werden kann. Darüber hinaus erscheint auch ein hundertprozentiger Nachweis von PD-L1 wie in der Arbeit von Yu et al. zweifelhaft, weshalb eine eventuelle Vorselektion der Patientengruppen in Erwägung gezogen werden sollte.

Eine ähnliche Beobachtung des Expressionsverhaltens zeigt sich des Weiteren auch in anderen Tumorentitäten. So fiel beim Vergleich der Expressionsraten von PD-L1 in NSCLC und dem malignen Melanom ebenfalls eine große Spannweite auf [118-122]. Hier waren ebenso die oben genannten Unterschiede in der Methodik auszumachen.

Von den 57 PD-L1+ Fällen waren 24 (42 %) stark (PD-L1+h) und 33 (58 %) schwach (PD-L1+l) angefärbt. Bisher ist unklar, ob die Differenzierung der Farbintensität in schwache und starke Färbung eine Konsequenz hat. Nach aktuellem Stand bietet sie jedoch keine zusätzliche Information bei der Beurteilung des Präparats [123].

Die Anzahl der Zulassungen für Checkpoint-Inhibitoren steigen stetig, daher sind einheitliche Angaben bezüglich Cut-Offs und Antikörperauswahl im jeweiligen Gewebe wichtig, um in Zukunft eine gezieltere Patientenauswahl zu ermöglichen und

Therapieerfolge zu verbessern. In diesem Kontext stellen Harmonisierungsstudien ein wichtiges Gut dar, um Untersuchungen und ihre Ergebnisse vergleichbar zu machen und zu vereinheitlichen. Eine bedeutende Rolle spielen dabei die bereits genannten Ringversuche, wie sie von der QuIP seit 2004 durchgeführt werden. Seit 2016 erfolgt durch die QuIP ein Ringversuch bezüglich PD-L1 in NSCLC. Demnach hat es bisher den Anschein, dass, obwohl Färbeunterschiede im Vergleich der einzelnen Antikörperklone auftreten, die Färbeergebnisse vergleichbar seien. Dennoch besteht die Gefahr für falsch interpretierte Ergebnisse [105, 124-126]. Eine Abhilfe für dieses Problem schaffen von unterschiedlichen Stellen validierte IHC Protokolle [127, 128]. Zusätzlich können Auswerte-Workshops den untersuchenden Pathologen helfen Sicherheit, Reproduzierbarkeit und Präzision im Umgang mit PD-L1 Färbungen zu gewinnen [129]. Die regelmäßige Teilnahme an zertifizierten Ringversuchen für Färbe- und auch Auswertequalität erfolgt im Leopoldina-Krankenhaus jährlich und wird auch bestanden, so dass die Auswertung nach etablierten Qualitätsstandards belegt werden kann.

Ein einheitliches oder vergleichbares Vorgehen für die Färbung und Auswertung von PD-L1 ist vor allem in Hinblick auf den therapeutischen Nutzen unumgänglich.

In Europa sind aktuell sechs Checkpoint-Inhibitoren, die therapeutisch gegen PD-1/PD-L1 gerichtet sind, zugelassen (Tabelle 14) [26, 27, 93-96]. Dabei sind lediglich Nivolumab und Pembrolizumab für die Therapie der HNSCC zugelassen. Die Zulassung gilt bislang nur für fortgeschrittene Karzinome oder Rezidive [26, 27].

**Tabelle 14: Übersicht über die in der EU zugelassenen Checkpoint-Inhibitoren gegen PD-1 und PD-L1.**

Wirkstoff (Handelsname) sowie Monat und Jahr der Zulassung

Hervorgehoben sind die Zulassungen für Therapieindikationen gegen HNSCC [26, 27, 93-96]

<b>Checkpoint-Inhibitor</b>	<b>Angriffspunkt</b>	<b>Zulassung für</b>
Nivolumab (Opdivo) zugelassen 06/15	PD-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Metastasiertes oder inoperables malignes Melanom</li> <li>- Therapierefraktäres lokal- oder fernmetastasiertes NSCLC</li> <li>- Fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rezidivierendes oder therapierefraktäres Hodgkin Lymphom</li> <li>- <b>Rezidivierendes oder metastasiertes HNSCC</b></li> <li>- Inoperables, lokal metastasiertes oder fernmetastasiertes Urothelkarzinom</li> </ul>
Pembrolizumab (Keytruda) zugelassen 07/15	PD-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Metastasiertes oder inoperables malignes Melanom; auch als adjuvante Therapie nach operativer Entfernung</li> <li>- Metastasiertes NSCLC mit positiver PD-L1-Exprimierung</li> <li>- Rezidivierendes oder therapierefraktäres Hodgkin Lymphom</li> <li>- Fortgeschrittenes oder metastasiertes Urothelkarzinom</li> <li>- <b>Inoperables, rezidivierendes oder metastasiertes HNSCC mit PD-L1-Expression</b></li> <li>- Fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom</li> </ul>
Avelumab (Bavencio) zugelassen 09/17	PD-L1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Metastasiertes Merkelzellkarzinom</li> <li>- Fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom</li> </ul>
Atezolizumab (Tecentriq) zugelassen 09/17	PD-L1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fortgeschrittenes oder metastasiertes Urothelkarzinom</li> <li>- Fortgeschrittenes oder metastasiertes NSCLC und SCLC</li> <li>- Triple-negatives Mammakarzinom</li> </ul>
Durvalumab (Imfinzi)	PD-L1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inoperables und fortgeschrittenes NSCLC mit PD-L1-Expression</li> </ul>

zugelassen 09/18		
Cemiplimab (Libtayo) zugelassen 06/19	PD-1	- Lokal fortgeschrittenes oder metastasiertes kutanes Plattenepithelkarzinom

Weiterhin erscheint es gut nachvollziehbar, dass Patienten, bei denen ein IHC-Nachweis von PD-L1 erfolgen konnte, mehr von einer Immuntherapie profitieren, als Patienten bei denen PD-L1 nicht nachgewiesen wurde. Garon et al. konnten diesbezüglich zeigen, dass NSCLC-Patienten mit 50 % oder mehr PD-L1+ Zellen besser auf die Therapie mit Pembrolizumab ansprechen als Patienten mit weniger als 50 % oder gar keinen PD-L1+ Zellen [116]. Dementsprechend wird im Rahmen der aktuellen S3-Leitlinie zum Lungenkarzinom im Falle des NSCLC und therapienaiven Patienten im Stadium IV geraten, die IHC-Untersuchung auf PD-L1 durchzuführen und im Tumor Proportion Score (TPS) anzugeben. Abhängig davon sei das Therapieprozedere zu entscheiden [130]. Ähnlich gestalten sich auch die Zulassungsbestimmungen der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) für Pembrolizumab bezogen auf HNSCC. So ist bei Patienten mit rezidivierenden oder metastasierten Karzinomen die Therapie mit Pembrolizumab als Mono- oder Kombinationstherapie als Erstlinientherapie möglich, wenn PD-L1 im CPS nachgewiesen werden konnte. Außerdem ist die Applikation von Pembrolizumab als Monotherapie zugelassen, wenn ein weiterer Progress der Erkrankung unter der Therapie platin-basierter Substanzen besteht und ein TPS von  $\geq 50\%$  vorliegt [131] (Tabelle 15). Beim TPS und CPS handelt es sich, wie im Methodik-Teil bereits erwähnt, um zwei verschiedene Scoring-Systeme zur Erfassung von IHC-Färbungen. Abhängig von der Tumorentität und dem gewählten Checkpoint-Inhibitor ist die Bestimmung vor Therapiebeginn erforderlich. Während beim TPS entsprechend dem Cologne-Score lediglich der prozentuale Anteil der angefärbten Tumorzellen berücksichtigt wird, fließen beim CPS sowohl Tumor- als Immunzellen in die Auswertung mit ein [129].

**Tabelle 15: Therapieoptionen mittels Checkpoint-Inhibitoren gegen HNSCC in Abhängigkeit der PD-L1-Expression**

[26, 27]

	Nivolumab	Pembrolizumab
Erstlinientherapie (Monotherapie oder Kombinationstherapie mit platinhaltigen Cytostatika, 5-FU)	-	PD-L1 CPS $\geq$ 1
Nach Gabe platinhaltiger Cytostatika	PD-L1 unabhängig	PD-L1 TPS $\geq$ 50 %

Im Hinblick auf die Therapie mit Nivolumab präsentierte sich in einer Studie von Sharma et al. ein anderer Sachverhalt hinsichtlich der PD-L1 Expression. Hier ergab sich kein Unterschied hinsichtlich der objektiven Ansprechrate zwischen PD-L1+ bzw. PD-L1-Patienten mit Urothelkarzinom [132]. Auch in der Untersuchung von Horn et al. zeigten sich ähnliche Ergebnisse. So profitierten NSCLC-Patienten mit einer höheren Anzahl von PD-L1+ Tumorzellen zwar mehr von einer Monotherapie mit Nivolumab im Vergleich zu Docetaxel. Dennoch zeigte sich auch bei Patienten mit einer PD-L1-Expression von < 1 % ein Vorteil der Therapie mit Nivolumab gegenüber der Monotherapie mit Docetaxel [72]. Ebenso fand sich in einer Studie an Patienten mit therapierefraktären HNSCC zwar eine signifikante Verbesserung des Überlebens bei der Therapie mit Nivolumab im Vergleich zur Kontrollgruppe, allerdings zeigten sich die Ergebnisse unabhängig vom PD-L1-Status [133].

Dementsprechend ist gemäß der EMA aktuell für die Therapie mit Nivolumab kein vorheriger obligater Nachweis von PD-L1 im Tumormaterial notwendig [134]. Auch im Rahmen einer Studie zu Pembrolizumab konnte trotz stark positivem PD-L1-Nachweis (>50 %) nur bei etwa der Hälfte der Patienten ein Ansprechen auf die Checkpoint-Inhibitor-Therapie beobachtet werden [73].

Die Untersuchungsergebnisse bezüglich des Ansprechens von Nivolumab und Pembrolizumab zeigen, dass neben den bekannten Faktoren der PD-1/PD-L1-Achse noch weitere zentrale Elemente eine Rolle spielen müssen; diese bleiben Gegenstand der aktuellen Forschung.

## PD-1

9 (8 %) der 118 Fälle des Kollektivs zeigten innerhalb und benachbart zum Tumorzellverband PD-1+ Lymphozyten. In 13 Fällen (11 %) lagen die PD-1+ Zellen lediglich benachbart und in 14 Fällen (12 %) lagen diese ausschließlich innerhalb des Tumorzellverbands. Damit zeigten insgesamt 31 % der Fälle PD-1+ Lymphozyten; in 68 % der Fälle waren keine PD-1+ Lymphozyten vorhanden.

Bei Betrachtung aller Fälle mit PD-1+i Lymphozyten ergibt sich eine Fallzahl von 22 Fällen (19 %). Im literarischen Vergleich zeigt sich ähnlich zu der Expression von PD-L1 ebenfalls eine große Spannweite, die insgesamt aber über den 19 % dieser Arbeit liegt. So zeigten sich bei Balermipas et al. eine Rate von 45,3 % PD-1+i Lymphozyten, bei Schneider et al. sogar eine Rate von 90,3 % [80, 85].

Dem gegenübergestellt zeigten in diesem Kollektiv insgesamt 23 Fälle (20 %) PD-1+ Lymphozyten benachbart zum Tumorverband. Auch hier divergierten die Ergebnisse im literarischen Vergleich zu der Studie von Sanchez-Canteli et al. mit 47,5 % PD-1+p [84]. Ähnlich zu der Expression von PD-L1 lässt sich auch bei PD-1 die Ursache der Unterschiede in verschiedenen Aspekten suchen. Zum einen in der differenten Methodik, die sich durch divergente Cut-Off-Werte (Tabelle 3) und verschiedenen PD-1-Antikörperklonen (Tabelle 16) unterscheidet.

**Tabelle 16: Übersicht über die für die PD-1 IHC verwendeten Klone und Verdünnungen der in dieser Arbeit zitierten Studien**

<b>Studie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Klon</b>	<b>Verdünnung</b>
Balermipas et al. (2017) [80]	Abcam	AB52587	1:100
Birtalan et al. (2018) [81]	Origene	UMAB199	1:100
Sanchez-Canteli et al. (2020) [84]	Cell Signaling Technology	EH33	1:200
Schneider et al. (2018) [85]	Abcam	nicht näher bezeichnet	1:100
Vorliegende Arbeit	Abcam	SP269	1:100

Auch im Falle von PD-1 sind Färbe- und Fixierfehler sowie Fehler in der Auswertung zu berücksichtigen.

Darüber hinaus können Vortherapien Einflüsse auf die PD-1-Expression haben. So konnte eine Reduktion von PD-1 nach der Gabe von Nivolumab in vitro beobachtet werden [135]. Auch ionisierende Strahlen durch Radiatio beeinflussen die Expression von PD-1 auf Immunzellen [136]. Aus diesem Grund sollten nicht nur hinsichtlich der Färbung und der Auswertung einheitliche Standards vorgegeben werden, auch mögliche Vortherapien sollten in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden. Diese Einwirkungen sind im vorliegenden Kollektiv allerdings auszuschließen.

## **4.2 PD-L1 und prognostische Hinweise**

Als anerkannte prognostische Faktoren für den Krankheitsverlauf gelten bislang unter anderem ein fortgeschrittenes Tumorstadium, die Lokalisation und der Resektionsstatus. Auch scheint die Tumordifferenzierung (Grading) einen gewissen Einfluss auf den weiteren klinischen Verlauf zu nehmen [99]. Der prognostische Wert von PD-L1 hingegen wurde zwar im Rahmen vieler Arbeiten und anhand einer Vielzahl von Tumorentitäten diskutiert, bislang konnte diesem jedoch noch kein eindeutiger Stellenwert zugeordnet werden.

Auch in diesem Kollektiv wurde die Expression von PD-L1 auf eine prognostische Aussagekraft untersucht.

### **PD-L1 und das Erkrankungsstadium**

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsstadium und dem PD-L1 Status beobachtet werden ( $\chi^2(3) = 10,3$ ,  $p = 0,02$ ).

Im Literaturvergleich demonstrierten auch andere Arbeiten hinsichtlich HNSCC einen Zusammenhang zwischen PD-L1 und einem bestimmten Tumormerkmal, jedoch beziehen sich die signifikanten Zusammenhänge wiederholend auf andere Merkmale. So konnten Müller et al. keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Tumorstadium und PD-L1 herstellen, jedoch zwischen PD-L1 und dem Erkrankungsalter sowie der Tumorlokalisierung [83]. Ursächlich könnten die genannten unterschiedlichen Ansätze in der Methodik sein.

Der Pearson-Chi-Quadrat-Test im Würzburger Kollektiv berücksichtigte nur die beiden eintretenden Fälle PD-L1 +/- gegenüber den auftretenden Tumorstadien. Im Kollektiv von Müller et al. hingegen wurde auch die Färbeintensität von PD-L1 in der Untersuchung berücksichtigt. Ob die Testdifferenzierung einen solchen signifikanten Unterschied ausmacht, bleibt zu überprüfen. Wahrscheinlicher lässt sich der vorliegende Unterschied auch auf die Kollektivgröße zurückführen. Die Arbeitsgruppe um Müller et al. konnte auf ein Kollektiv zugreifen, das mehr als doppelt so viele Patientenfälle beinhaltete (293 Fälle vs. 118 Fälle in dieser Arbeit). Zu beachten ist allerdings, dass die 293 Fälle in zwei Kohorten unterteilt wurden, sodass die einzelnen Kohorten 98 beziehungsweise 195 Fälle aufwiesen. Auch wies jeweils nur die Kohorte mit der größeren Fallzahl die signifikanten Zusammenhänge auf. Die kleinere Kohorte zeigte keine signifikanten Zusammenhänge. Darüber hinaus findet sich auch ein Unterschied in den Einschlusskriterien: In dieser Arbeit wurden nur Fälle eingeschlossen, die zum Operationszeitpunkt keine Fernmetastasierung aufwiesen. Im Kollektiv von Müller et al. gab es acht Fälle mit einer Fernmetastasierung und zusätzlich 31 Fälle über deren Metastasierungsstatus keine Informationen vorlagen.

Zusätzlich kann auch eine Gesamtbetrachtung aller HNSCC-Fälle zu einer Verzerrung des Gesamtergebnisses führen, da die diversen Entitäten, welche im HNSCC zusammengefasst werden, im statistischen Vergleich unterschiedliche Verläufe und bei einem schnelleren Krankheitsverlauf dementsprechend gehäuft höhergradige Tumorstadien zeigen. So fällt auf, dass das Hypopharynxkarzinom im Vergleich zum Larynxkarzinom ein deutlich schlechteres Outcome mit einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate aufweist [137]. Aus diesem Grund sollten die einzelnen Untergruppen bevorzugt isoliert voneinander verglichen werden.

Eine weitere Studie von Schneider et al. konnte ebenfalls einen Zusammenhang zwischen PD-L1 und einem Tumormerkmal aufzeigen. Sie demonstrierte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Stadium der Lymphknotenmetastasierung und der PD-L1 Expression [85]. Ähnlich zum Kollektiv der vorliegenden Arbeit wurde auch hier nicht die Färbeintensität berücksichtigt, sondern lediglich, ob das PD-L1-Protein in HNSCC exprimiert wurde. Auch zeigte das Kollektiv mit 129 eingeschlossenen Fällen eine vergleichbare Fallzahl (129 Fälle vs. 118 Fälle) auf. Allerdings fällt beim näheren Vergleich beider Kollektive ein Unterschied in der PD-L1-Expression auf. Im Kollektiv

der vorliegenden Arbeit zeigten von den 118 Fällen 57 (48,3 %) eine PD-L1+ Färbung und 58 (49,2 %) eine PD-L1- Färbung. Hingegen wiesen nur 33 % der Fälle von Schneider et al. eine positive Färbereaktion auf, 67 % zeigten ein PD-L1- Färbepild. Zwar wurden in beiden Arbeiten nur Membranfärbungen berücksichtigt, jedoch wurde der Cut-Off-Wert in der vorliegenden Arbeit auf  $\geq 1$  % festgelegt, während dieser in der Arbeit von Schneider et al. bei  $\geq 5$  % lag.

Ein Vergleich der Ergebnisse der zitierten Arbeiten zeigt Tabelle 17.

**Tabelle 17: Vergleich statistischer Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu den Ergebnissen von Müller et al. und Schneider et al. im Hinblick auf Zusammenhänge zwischen einer positiven PD-L1-Expression und Tumormerkmalen von HNSCC**

Die signifikanten Ergebnisse sind mit einem „+“ markiert, die nicht-signifikanten mit einem „-“.

Kollektiv	Alter	Geschlecht	Grading	T-Status	N-Status	Lokal.
Vorliegende Arbeit (118 Fälle)	- p = 0,33	- p = 0,32	- p = 0,68	+ p = 0,02	- p = 0,4	- p = 0,33
Müller et al. [83]	-/+	-	-	-	-	-/+
(Kohorte 1: 98 Fälle) (Kohorte 2: 195 Fälle)	p = 0,235 p = 0,044	p = 0,883 p = 0,673	p = 0,427 p = 0,697	p = 0,581 P = 0,138	p = 0,758 p = 0,115	p = 0,771 p = 0,026
Schneider et al. [85] (129 Fälle)	- p = 0,7217	- p = 0,3681	-	- p = 0,9999	+ p = 0,0223	-

Auch in anderen Entitäten fielen signifikante Zusammenhänge zwischen der PD-L1-Expression und Tumormerkmalen auf. So konnte in Untersuchungen an NSCLC ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Tumor-Stadium und der PD-L1-Expression aufgezeigt werden [138, 139]. Andere Studien konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen [140, 141].

Ob allerdings ein Zusammenhang zwischen einer hohen PD-L1-Expression mit einem prognostisch ungünstigeren Tumorstadium besteht, da die Expression von PD-L1 mit einem aggressiveren Tumorwachstum assoziiert ist, oder, ob die PD-L1-Expression mit Fortschreiten der Tumorerkrankung ohnehin zunimmt, ist unklar und bleibt zu überprüfen. Interessant wäre die Frage, ob therapienaive PD-L1+ HNSCC häufiger zu einem Rezidiv neigen als eine PD-L1- Vergleichsgruppe; möglicherweise könnten

Patienten mit PD-L1+ Tumoren dann von einer frühzeitigeren Therapie mit einem Checkpoint-Inhibitor profitieren.

### **PD-L1 und das Gesamtüberleben**

Eine weitere interessante statistische Auffälligkeit zeigt sich im Überlebenszeitraum der Patienten im Hinblick auf die Anzahl der PD-L1+ gefärbten Zellen. Obwohl das Ergebnis mit  $p = 0,08$  oberhalb des Signifikanzniveaus von  $\alpha = 0,05$  liegt, zeigt sich zumindest eine Tendenz, in der ein vermehrtes Vorkommen von PD-L1 mit einem schlechteren Überleben einhergeht.

Ähnlich dem Ergebnis dieser Arbeit konnten Müller et al. eine starke Korrelation zwischen der Expression von PD-L1 und dem Gesamtüberleben beobachten ( $p < 0,01$ ) [83]. Zwar bezog sich die Untersuchung von Müller et al. auf die Färbeintensität und nicht wie in dieser Untersuchung auf die quantitative PD-L1-Expression, dennoch weist dies auf einen potenziellen Einfluss von PD-L1 auf das Gesamtüberleben hin.

Ein möglicher Denkansatz könnte ein erfolgreicherer „immune escape“ des Tumors bei vermehrtem Auftreten von PD-L1 sein.

Hinzu kommt ein weiterer Aspekt, den es in diesem Zusammenhang zu beachten gilt: In dieser Arbeit konnte ein Hinweis darauf beobachtet werden, dass die Färbeintensität konkordant zum quantitativen Auftreten von PD-L1 ist ( $p = 0,09$ ). Das bedeutet konkret, dass eine größere Gruppe angefärbter PD-L1-Zellen in Summe ein intensiveres Färbebild schaffen könnte. Im Falle von Müller et al. könnte dementsprechend ebenso ein Zusammenhang zwischen dem quantitativen Vorkommen von PD-L1 und dem Gesamtüberleben vorliegen und nicht nur zwischen der Färbeintensität im Sinne einer starken oder schwachen Färbung. Leider wurde dies nicht weiter untersucht.

Weiterhin zeigte – im Gegensatz zu dem vermuteten Einfluss von PD-L1 auf das Gesamtüberleben – eine Meta-Analyse 23 verschiedenerer Studien, die die PD-L1-Expression in HNSCC im Hinblick auf das Überleben untersuchte, statistisch keine wesentliche prognostische Rolle von PD-L1 auf. Dabei konnte sowohl im Gesamtüberleben, dem krankheitsfreien Überleben und dem krankheitsspezifischen Überleben keine Unterschiede zwischen PD-L1- und PD-L1+ Fällen nachgewiesen werden. Lediglich in Bezug auf das progressionsfreie Überleben konnte ein besserer

Verlauf für PD-L1+ Karzinome aufgezeigt werden [142]. Allerdings wurde auch hier kein expliziter Bezug auf die quantitative PD-L1 Expression genommen.

Es existieren diverse Erklärungsansätze, welche die differente Expression von PD-L1 thematisieren. Zum einen die bereits erwähnten Unterschiede bezüglich der Scoring-Systeme, Cut-Off-Werte und verschiedene Antikörper. Weiterhin gibt es andere Ursachen, wie z.B. der Verlust des Tumorsuppressorgens PTEN, die mit einer erhöhten PD-L1-Expression einhergehen [143]. Auch gibt es Hinweise, dass die Expression im Tumorgewebe auch unter onkologischen Therapien nicht konstant ist, sondern einem dynamischen Verlauf unterliegt [144, 145].

### **Wert von PD-L1 als prognostischer und prädiktiver Marker**

Diverse Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass die PD-L1 Expression im Tumorgewebe keine eindeutige Aussage über den weiteren Krankheitsverlauf gibt.

Auch zeigt der PD-L1 Status hinsichtlich der Therapiewirksamkeit nur eine Aussagekraft in der Abhängigkeit von der Tumorentität. So konnte in einer Studie bezüglich der Wirksamkeit von Pembrolizumab bei NSCLC trotz stark positivem Nachweis von PD-L1 nur in etwa der Hälfte der Fälle ein Therapieansprechen beobachtet werden [73]. Ein ähnliches Ergebnis zeigt eine Untersuchung zu der Wirksamkeit von Nivolumab in der Therapie von malignen Melanomen: Der Therapieerfolg war unabhängig von PD-L1 [122].

Ebenso spricht sich die EMA für die Forschung an weiteren prognostischen und prädiktiven Markern unabhängig des PD-L1-Status aus, um die Wirksamkeit der onkologischen Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren zu verifizieren und den Behandlungserfolg besser abzuschätzen [131, 134].

Verschiedenste Studien wurden diesbezüglich durchgeführt; ein vielversprechender prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf die Immuntherapie stellt dabei die Tumormutationslast dar.

Die Tumormutationslast (Tumor Mutation Burden; TMB) beschreibt die Anzahl an somatischen Tumor-Mutationen, also Mutationen, die sich nicht in den Keimzellen, sondern lediglich in der Tumor-DNA nachweisen lassen. In Untersuchungen konnten sowohl innerhalb als auch zwischen verschiedenen Tumorentitäten deutliche Unterschiede in der Anzahl somatischer Mutationen aufgezeigt werden. So variieren

diese von 0.001/Megabase bis hin zu mehr als 400/Megabase [146]. Aktuell wird die TMB als neuer prädiktiver Biomarker für die Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren diskutiert. Dabei wiesen Patienten, bei denen eine hohe TMB auffiel, im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen TMB ein besseres Gesamtüberleben unter den diversen Immuntherapien auf [147]. Diesbezüglich konnte auch eine Studie von Hellmann et al. zeigen, dass therapie-naive NSCLC Patienten mit einer hohen TMB, unabhängig von PD-L1, ein besseres Ansprechen auf eine Therapie mit Nivolumab und Ipilimumab zeigten als Patienten, die mit Chemotherapie therapiert wurden [148].

Zusammenfassend liegt das Problem in der Verwendung von PD-L1 als prognostischer Biomarker in Folgendem:

Die Expression ist nicht einheitlich, sie ist also von Tumorgewebe zu Tumorgewebe unterschiedlich [149]. Auch innerhalb der gleichen Tumorentität zeigen sich Diskrepanzen [86, 150]. Weiterhin zeigt die PD-L1 Expression einen dynamischen Verlauf und ist abhängig von verschiedenen Einflüssen wie z.B. laufenden (Radio-) Chemotherapien [144, 145]. Auch die multiplen Testverfahren machen eine einheitliche Auswertung nicht leicht. Diverse Antikörper, IHC-Verfahren und Cut-Off-Werte sorgen für nicht vergleichbare Ergebnisse [151]. Auch als therapeutisch prädiktiver Marker ist der Stellenwert von PD-L1 noch nicht eindeutig, denn auch bei Patienten ohne PD-L1 Expression konnte in Abhängigkeit von der Tumorentität ein Therapieerfolg nachgewiesen werden [72].

### **4.3 Korrelationen zwischen PD-L1, PD-1 und CD5**

In dieser Arbeit konnten zwischen den oben genannten Markern signifikante Korrelationen beobachtet werden.

So zeigte sich zwischen CD5<sup>+</sup>i und PD-1<sup>+</sup>i ( $r_s = 0,27$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 115$ ) sowie zwischen CD5<sup>+</sup>p und PD-1<sup>+</sup>p ( $r_s = 0,40$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 115$ ) Lymphozyten eine positive signifikante Korrelation. Da es sich sowohl bei CD5 als auch bei PD-1 um Oberflächenantigene von T-Lymphozyten handelt [38, 152], ist das signifikante Ergebnis dieser beiden Korrelationen schlüssig. Dementsprechend ist ein vermehrtes Vorkommen von PD-1 mit einem gleichzeitig erhöhten Vorkommen von CD5 assoziiert.

Die positive signifikante Korrelation zwischen CD5+p und PD-1+i Zellen ( $r_s = 0,24$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 115$ ) ist auf den ersten Blick nicht so einfach zu erklären. Sammeln sich allerdings mehr Lymphozyten und damit auch mehr CD5+ Zellen benachbart zum Tumorzellverband an, ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass auch mehr Lymphozyten und damit auch mehr PD-1+ Zellen den Tumorverband infiltrieren. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass keine signifikante Korrelation zwischen CD5+p und CD5+i vorliegt. Denn nicht nur das Vorkommen von PD-1i, sondern auch das Vorkommen von CD5i müssten in diesem Fall korrelieren. Ein möglicher Erklärungsansatz findet sich auch hier in einem potenziellen Fehler der Färbung oder Auswertung. Da es sich bei CD5 um einen generellen T-Zell-Marker handelt, wäre zu erwarten, dass in jedem der 118 Kollektivfälle T-Lymphozyten zu finden seien. Jedoch wurden nur in 84 % der Fälle CD5+ Lymphozyten nachgewiesen, davon traten in 20 % der Fälle die Zellen lediglich innerhalb des Tumorverbandes auf und in 32 % der Fälle zeigten sie sich ausschließlich benachbart zum Tumorverband. Da es sich bei den verwendeten Micro-Arrays nur um kleine Ausschnitte des Tumors handelt, ist es möglich, dass an anderen Tumorstellen sich das Vorkommen der Lymphozyten und auch die Expression von PD-1 anders präsentieren könnte.

Weiterhin stellt sich im Rahmen der Untersuchung eine Korrelation zwischen der PD-L1 Expression und CD5+i dar ( $r_s = 0,4$ ,  $p < 0,1$ ,  $n = 56$ ), es handelte sich hierbei um eine positive Korrelation. Auch Vassilakopoulou et al. konnten in ihrer Arbeit an Plattenepithelzellkarzinomen des Larynx einen Hinweis zwischen PD-L1 und TIL in einer Rangkorrelation nach Spearman beobachten ( $p = 0,051$ ) [153]. Ebenso fanden sich auch in anderen Tumorentitäten wie Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus oder Gallenblasenkarzinomen signifikante positive Korrelationen zwischen PD-L1 und TIL [154, 155].

Hinsichtlich eines möglichen Erklärungsansatzes müssen die Faktoren berücksichtigt werden, die umgekehrt zu einer PD-L1 Expression führen. So schütten TIL Zytokine aus, welche eine vermehrte PD-L1 Expression induzieren [45, 156].

Die letzten signifikanten positiven Korrelationen in dieser Arbeit zeigten sich zwischen der Färbeintensität von PD-L1 und CD5+i ( $r_s = 0,35$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 114$ ) bzw. zwischen

der Färbeintensität von PD-L1 und PD-1+ i (:  $r_s = .2$ ,  $p = .04$ ,  $n = 114$ ). Wie in Kapitel 4.1 bereits erwähnt, ergibt sich nach aktuellem Stand kein zusätzlicher Vorteil in der Auswertung der Färbeintensität im Vergleich zur prozentualen Anzahl der PD-L1+ Zellen [123]. Hierbei ist auch weiterhin zu bedenken, dass die Möglichkeit einer Konkordanz zwischen Färbeintensität und Anzahl der Färbungen besteht. Auch wenn das Ergebnis nicht signifikant war, so zeigte sich doch eine gewisse Tendenz ( $\chi^2_{\text{Yates}} = 2,83$ ,  $p = 0,09$ ). Dementsprechend könnte in diesem Fall die prozentuale Anzahl der PD-L1+ Zellen und nicht ausschließlich die Färbeintensität mit CD5 und PD-1 korrelieren. Gegen diese These spricht allerdings die fehlende Korrelation in der Untersuchung zwischen PD-1 und dem Cologne-Score. Um diese Problematik zu lösen, wäre ein Studienansatz ratsam, bei dem keine Verzerrung des Ergebnisses durch den Untersucher entsteht. Eine mögliche exaktere Quantifizierung könnte dabei durch PD-L1 mRNA erfolgen. Der Vergleich von PD-L1 mRNA mit der Expression von PD-L1 lieferte jedoch bisher noch keine eindeutigen Ergebnisse [157, 158] und muss weiter überprüft werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der modernen Tumorthherapie sind Checkpoint-Inhibitoren ein fester Bestandteil. Die Oberflächenproteine PD-L1 und PD-1 stellen die Angriffspunkte dieser spezifischen Therapie dar. Die Datenlage hinsichtlich PD-L1 in HNSCC ist sehr heterogen. Diese Arbeit beschäftigte sich daher mit der Expression von PD-L1 und PD-1 in einem Kollektiv von 118 Plattenepithelkarzinomen in Larynx und Hypopharynx und einer prognostischen Aussagekraft hinsichtlich mehrerer histopathologischer und epidemiologischer Faktoren. Außerdem wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression von PD-L1, PD-1 und CD5 als T-Zell-Marker in besagtem Kollektiv untersucht.

Die IHC-Färbungen wurden lichtmikroskopisch an tissue micro arrays untersucht. Für die Auswertung von PD-L1 wurde der bereits etablierte Cologne-Score verwendet, welcher zum einen zunächst erweitert und anschließend zwecks einer fundierten statistischen Auswertung ergänzend modifiziert wurde. Für CD5 und PD-1 wurden eigene Cut-Off-Werte generiert.

48 % der Fälle waren PD-L1+, die Spannweite im Literaturvergleich schwankt zwischen 30 – 90 %. PD-1+ waren insgesamt 31% der Fälle, auch hier zeigen sich deutliche Abweichungen zu den vorliegenden Publikationen. Hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem T-Stadium und der PD-L1-Expression aufgezeigt werden. Ob dies Einfluss auf mögliche Behandlungsstrategien hat, bleibt Gegenstand weiterer Forschung. Auch im Literaturvergleich finden sich wiederholt signifikante prognostische Zusammenhänge, jedoch beziehen sich diese auf differente Faktoren. Ursächlich dafür sind aller Wahrscheinlichkeit nach Diskrepanzen in der PD-L1-Expression sowie deren Schwankungen durch äußere Einflüsse und nicht standardisierte Testverfahren. Es zeigten sich weiterhin Korrelationen zwischen den Markern, welche sich abschließend nicht alle gänzlich herleiten lassen.

Zusammenfassend könnten einheitliche Testverfahren die Datenlage zu PD-L1 und PD-1 homogenisieren, auch mögliche Vortherapien sollten dementsprechend berücksichtigt werden. Allerdings erscheint die prognostische Aussagekraft von PD-L1 und auch von PD-1 insgesamt aufgrund der inkonstanten Expression hochgradig eingeschränkt, sodass sich in Zukunft vermehrt auf andere Marker konzentriert werden sollte.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Riella, L.V., et al., *Role of the PD-1 pathway in the immune response*. Am J Transplant, 2012. **12**(10): p. 2575-87.
2. Brunet, J.F., et al., *A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4*. Nature, 1987. **328**(6127): p. 267-70.
3. Pardoll, D.M., *Immunology beats cancer: a blueprint for successful translation*. Nat Immunol, 2012. **13**(12): p. 1129-32.
4. Linsley, P.S., et al., *Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation*. J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 721-30.
5. Linsley, P.S., et al., *CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7*. J Exp Med, 1991. **174**(3): p. 561-9.
6. Gross, J.A., E. Callas, and J.P. Allison, *Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse*. J Immunol, 1992. **149**(2): p. 380-8.
7. Lucas, P.J., et al., *Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response*. J Immunol, 1995. **154**(11): p. 5757-68.
8. Green, J.M., et al., *Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice*. Immunity, 1994. **1**(6): p. 501-8.
9. Iezzi, G., K. Karjalainen, and A. Lanzavecchia, *The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells*. Immunity, 1998. **8**(1): p. 89-95.
10. Freeman, G.J., et al., *Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7*. J Exp Med, 1991. **174**(3): p. 625-31.
11. Krummel, M.F. and J.P. Allison, *CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 459-65.
12. Krummel, M.F., T.J. Sullivan, and J.P. Allison, *Superantigen responses and co-stimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion in vitro and in vivo*. Int Immunol, 1996. **8**(4): p. 519-23.
13. Leach, D.R., M.F. Krummel, and J.P. Allison, *Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade*. Science, 1996. **271**(5256): p. 1734-6.
14. The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2018*. 19.05.2020]; Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/prize-announcement/>.
15. Hanaizi, Z., et al., *The European Medicines Agency review of ipilimumab (Yervoy) for the treatment of advanced (unresectable or metastatic) melanoma in adults who have received prior therapy: summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use*. Eur J Cancer, 2012. **48**(2): p. 237-42.
16. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). *CHMP post-authorisation summary of positive opinion for Yervoy*. 2013 05.12.2017]; Available from: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002213/human\\_med\\_001465.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002213/human_med_001465.jsp&mid=WC0b01ac058001d124).
17. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. Embo j, 1992. **11**(11): p. 3887-95.
18. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1365-9.
19. Tseng, S.Y., et al., *B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 839-46.
20. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.

21. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 261-8.
22. Nishimura, H., et al., *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 141-51.
23. Nishimura, H., et al., *Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice*. Science, 2001. **291**(5502): p. 319-22.
24. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
25. Brahmer, J.R., et al., *Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates*. J Clin Oncol, 2010. **28**(19): p. 3167-75.
26. European Medicines Agency. *Keytruda - Pembrolizumab* 30.01.2020]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/medicines/human/EPAR/keytruda>.
27. European Medicines Agency. *Opdivo - Nivolumab*. 30.01.2020]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/medicines/human/EPAR/opdivo>.
28. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 116-26.
29. Barclay, A.N., *Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules*. Semin Immunol, 2003. **15**(4): p. 215-23.
30. Zak, K.M., et al., *Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2*. Structure, 2017. **25**(8): p. 1163-1174.
31. Zhang, X., et al., *Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 337-47.
32. The Human Protein Atlas. *PDCD1*. Pathology Atlas 13.02.2018]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000188389-PDCD1/pathology>.
33. Ponten, F., K. Jirstrom, and M. Uhlen, *The Human Protein Atlas--a tool for pathology*. J Pathol, 2008. **216**(4): p. 387-93.
34. Okazaki, T. and T. Honjo, *PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application*. Int Immunol, 2007. **19**(7): p. 813-24.
35. Okazaki, T., et al., *PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13866-71.
36. Parry, R.V., et al., *CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9543-53.
37. Zak, K.M., et al., *Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1*. Structure, 2015. **23**(12): p. 2341-8.
38. Agata, Y., et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 765-72.
39. Nishimura, H., et al., *Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes*. Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 773-80.
40. Liu, Y., et al., *Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers*. Oncogene, 2017. **36**(44): p. 6143-6153.
41. Xiao, Y., et al., *RGMB is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance*. J Exp Med, 2014. **211**(5): p. 943-59.
42. Butte, M.J., et al., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 111-22.
43. Chen, Y., et al., *A dimeric structure of PD-L1: functional units or evolutionary relics?* Protein Cell, 2010. **1**(2): p. 153-60.

44. The Human Protein Atlas. CD274. Pathology Atlas 04.04.2018]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000120217-CD274/tissue>.
45. Eppihimer, M.J., et al., *Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells*. *Microcirculation*, 2002. **9**(2): p. 133-45.
46. Nazareth, M.R., et al., *Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(9): p. 5552-62.
47. Ghebeh, H., et al., *The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors*. *Neoplasia*, 2006. **8**(3): p. 190-8.
48. Perrot, I., et al., *Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage*. *J Immunol*, 2007. **178**(5): p. 2763-9.
49. Sharpe, A.H., *Mechanisms of costimulation*. *Immunol Rev*, 2009. **229**(1): p. 5-11.
50. Curtsinger, J.M., C.M. Johnson, and M.F. Mescher, *CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine*. *J Immunol*, 2003. **171**(10): p. 5165-71.
51. Martin, P.J., et al., *A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes*. *J Immunol*, 1986. **136**(9): p. 3282-7.
52. Lin, D.Y., et al., *The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(8): p. 3011-6.
53. Jones, R.G., et al., *CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly*. *J Exp Med*, 2002. **196**(3): p. 335-48.
54. Burr, J.S., et al., *Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL*. *J Immunol*, 2001. **166**(9): p. 5331-5.
55. Boise, L.H., et al., *CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL*. *Immunity*, 1995. **3**(1): p. 87-98.
56. Sheppard, K.A., et al., *PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta*. *FEBS Lett*, 2004. **574**(1-3): p. 37-41.
57. Chemnitz, J.M., et al., *SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation*. *J Immunol*, 2004. **173**(2): p. 945-54.
58. Yokosuka, T., et al., *Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2*. *J Exp Med*, 2012. **209**(6): p. 1201-17.
59. Rota, G., et al., *Shp-2 Is Dispensable for Establishing T Cell Exhaustion and for PD-1 Signaling In Vivo*. *Cell Rep*, 2018. **23**(1): p. 39-49.
60. Zhang, W., et al., *LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation*. *Cell*, 1998. **92**(1): p. 83-92.
61. Bubeck Wardenburg, J., et al., *Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(33): p. 19641-4.
62. Patsoukis, N., et al., *PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2*. *Mol Cell Biol*, 2013. **33**(16): p. 3091-8.
63. Patsoukis, N., D. Sari, and V.A. Boussiotis, *PD-1 inhibits T cell proliferation by upregulating p27 and p15 and suppressing Cdc25A*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(23): p. 4305-9.
64. Patsoukis, N., et al., *Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation*. *Sci Signal*, 2012. **5**(230): p. ra46.

65. Karwacz, K., et al., *PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8+ T cells*. EMBO Mol Med, 2011. **3**(10): p. 581-92.
66. Francisco, L.M., et al., *PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 3015-29.
67. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
68. Mempel, T.R., et al., *Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation*. Immunity, 2006. **25**(1): p. 129-41.
69. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
70. Schmetterer, K.G., A. Neunkirchner, and W.F. Pickl, *Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation*. Faseb j, 2012. **26**(6): p. 2253-76.
71. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
72. Horn, L., et al., *Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Two-Year Outcomes From Two Randomized, Open-Label, Phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057)*. J Clin Oncol, 2017. **35**(35): p. 3924-3933.
73. Reck, M., et al., *Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(19): p. 1823-1833.
74. Barnes, B., et al., *Krebs in Deutschland für 2015/2016*, Robert Koch Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V., Editors. 2019: Berlin. p. 17.
75. Vassileiou, A., et al., *Laryngeal cancer: smoking is not the only risk factor*. B-ent, 2012. **8**(4): p. 273-8.
76. Rothman, K. and A. Keller, *The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx*. J Chronic Dis, 1972. **25**(12): p. 711-6.
77. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 2017: Berlin. p. 24, 52.
78. Barnes, B.e.a., *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*, Robert-Koch-Institut, Editor. 2016, Robert-Koch-Institut: Berlin.
79. Robert-Koch-Institut and Zentrum für Krebsregisterdaten. *Datenbankabfrage - Inzidenz Larynx- und Hypopharynxkarzinom - 2003 - 2016*. 24.04.2019]; Available from: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankabfrage\\_stufe2\\_form.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe2_form.html).
80. Balermipas, P., et al., *The PD-1/PD-L1 axis and human papilloma virus in patients with head and neck cancer after adjuvant chemoradiotherapy: A multicentre study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG)*. Int J Cancer, 2017. **141**(3): p. 594-603.
81. Birtalan, E., et al., *Expression of PD-L1 on Immune Cells Shows Better Prognosis in Laryngeal, Oropharyngeal, and Hypopharyngeal Cancer*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2018. **26**(7): p. e79-e85.
82. Burtneß, B., et al., *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, 2019. **394**(10212): p. 1915-1928.
83. Muller, T., et al., *PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma*. Oncotarget, 2017. **8**(32): p. 52889-52900.

84. Sanchez-Canteli, M., et al., *PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and better prognosis in patients with HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas*. *Cancer Immunol Immunother*, 2020. **69**(10): p. 2089-2100.
85. Schneider, S., et al., *PD-1 and PD-L1 expression in HNSCC primary cancer and related lymph node metastasis - impact on clinical outcome*. *Histopathology*, 2018. **73**(4): p. 573-584.
86. Straub, M., et al., *CD274/PD-L1 gene amplification and PD-L1 protein expression are common events in squamous cell carcinoma of the oral cavity*. *Oncotarget*, 2016. **7**(11): p. 12024-34.
87. Yu, D., et al., *Expression of Programmed Death-Ligand 1 in Laryngeal Carcinoma and its Effects on Immune Cell Subgroup Infiltration*. *Pathol Oncol Res*, 2018.
88. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(1): p. 27-36.
89. Wang, R.F., *Tumor antigens discovery: perspectives for cancer therapy*. *Mol Med*, 1997. **3**(11): p. 716-31.
90. Weinberg, R.A. and D. Hanahan, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-674.
91. Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, *Cancer immunotherapy comes of age*. *Nature*, 2011. **480**(7378): p. 480-9.
92. Beatty, G.L. and W.L. Gladney, *Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(4): p. 687-92.
93. European Medicines Agency. *Tecentriq - Atezolizumab*. 30.01.2020]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/medicines/human/EPAR/tecentriq>.
94. European Medicines Agency. *Bavencio - Avelumab*. 30.01.2020]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/medicines/human/EPAR/bavencio>.
95. European Medicines Agency. *Libtayo - Cemiplimab*. 30.01.2020]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/libtayo>.
96. European Medicines Agency. *Imfinzi - Durvalumab*. 30.01.2020]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/imfinzi>.
97. Ferris, R.L., et al., *Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(19): p. 1856-1867.
98. Brahmer, J., et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(2): p. 123-35.
99. *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Larynxkarzinoms, Langversion 1.0*. 2019: Berlin. p. 27, 117.
100. Wang, A., et al., *The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis*. *Eur J Surg Oncol*, 2015. **41**(4): p. 450-6.
101. Huang, Y., et al., *The prognostic significance of PD-L1 in bladder cancer*. *Oncol Rep*, 2015. **33**(6): p. 3075-84.
102. Hofmann, L., et al., *Cutaneous, gastrointestinal, hepatic, endocrine, and renal side-effects of anti-PD-1 therapy*. *Eur J Cancer*, 2016. **60**: p. 190-209.
103. Barnes, B., et al., *Krebs in Deutschland für 2015/2016*, Robert Koch Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V., Editors. 2019: Berlin. p. 24-24, 56-57.
104. Ringeling, J., *Expression von GLUT-1, p-Akt, M2-PK und p53 in Plattenepithelkarzinomen des Larynx und Hypopharynx*. 2011, Pathologisches Institut Würzburg: Würzburg.
105. Scheel, A.H., et al., *Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas*. *Mod Pathol*, 2016. **29**(10): p. 1165-72.
106. Bristol Myers Squibb. *PD-L1-Testung im Überblick*. 2020 07.11.2021]; Available from: [https://www.trillium.de/fileadmin/user\\_upload/PD-L1-TESTUNG\\_im\\_UEberblick.pdf](https://www.trillium.de/fileadmin/user_upload/PD-L1-TESTUNG_im_UEberblick.pdf).

107. Bortz, J. and N. Döring, *Forschungsmethoden und Evaluation*. 5 ed. 2015: , Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
108. Universität Zürich. *Pearson Chi-Quadrat-Test (Kontingenzanalyse)*. Methodenberatung 25.11.2019]; Available from: [https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/zusammenhaenge/pearsonzush.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/zusammenhaenge/pearsonzush.html).
109. Universität Zürich. *t-Test für unabhängige Stichproben*. Methodenberatung 01.12.2019]; Available from: [https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/unterschiede/zentral/ttestunabh.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/unterschiede/zentral/ttestunabh.html).
110. Weiß, C., *Basiswissen Medizinische Statistik*, C. Weiß, Editor. 2019, Springer: Berlin; Heidelberg. p. 262-264.
111. Universität Zürich. *Rangkorrelation nach Spearman*. Methodenberatung 01.12.2019]; Available from: [https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/zusammenhaenge/rangkorrelation.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/zusammenhaenge/rangkorrelation.html).
112. , Q.-I.P.Q.G. *Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie QuIP GmbH*. 11.02.2020]; Available from: [https://quip.eu/de\\_DE/](https://quip.eu/de_DE/).
113. Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie - QuIP GmbH. *HNSCC – Plattenepithelkarzinome des Kopfes und des Halses*. 2021 17.07.2021]; Available from: <https://www.pdl1portal.eu/hnsc/>.
114. Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie - QuIP GmbH. *4. Antikörperauswahl / Etablierung. Über PD-L1 2021* 17.07.2021]; Available from: <https://www.pdl1portal.eu/>.
115. Bussolati, G. and E. Leonardo, *Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry*. J Clin Pathol, 2008. **61**(11): p. 1184-92.
116. Garon, E.B., et al., *Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2015. **372**(21): p. 2018-28.
117. Borghaei, H., et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer*. N Engl J Med, 2015. **373**(17): p. 1627-39.
118. Patel, S.P. and R. Kurzrock, *PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(4): p. 847-56.
119. Tsao, M.S., et al., *PD-L1 protein expression assessed by immunohistochemistry is neither prognostic nor predictive of benefit from adjuvant chemotherapy in resected non-small cell lung cancer*. Ann Oncol, 2017. **28**(4): p. 882-889.
120. Akiyama, M., et al., *PD-L1 expression in malignant melanomas of the skin and gastrointestinal tract*. Oncol Lett, 2020. **19**(3): p. 2481-2488.
121. Weber, J.S., et al., *Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(4): p. 375-84.
122. Larkin, J., et al., *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(1): p. 23-34.
123. Agaimy, A. and W. Weichert, *[Grading of head and neck neoplasms]*. Pathologe, 2016. **37**(4): p. 285-92.
124. Jöhrens, K., et al., *PD-L1 IHC beim Bronchialkarzinom, Q1/2017*, Q.-I.P.Q.G. , Editor. 2017.
125. Weichert, W., et al., *QuIP-Ringversuch zur PD-L1 Expressionsbestimmung in nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC)*. Der Pathologe, 2017. **6**: p. 563 - 564.
126. Scheel, A.H., et al., *Interlaboratory concordance of PD-L1 immunohistochemistry for non-small-cell lung cancer*. Histopathology, 2018. **72**(3): p. 449-459.

127. Rimm, D.L., et al., *A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer*. JAMA Oncol, 2017. **3**(8): p. 1051-1058.
128. Røge, R., M. Vyberg, and S. Nielsen, *Accurate PD-L1 Protocols for Non-Small Cell Lung Cancer can be Developed for Automated Staining Platforms With Clone 22C3*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2017. **25**(6): p. 381-385.
129. Schildhaus, H.U., [*Predictive value of PD-L1 diagnostics*]. Pathologe, 2018. **39**(6): p. 498-519.
130. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0 AWMF-Registernummer: 020/007OL*. 2018 13.02.2020]; Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/020-007OL\\_I\\_S3\\_Lungenkarzinom\\_2018-03.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-007OL_I_S3_Lungenkarzinom_2018-03.pdf).
131. European Medicines Agency. *Keytruda - Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels* 3]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information_de.pdf).
132. Sharma, P., et al., *Nivolumab monotherapy in recurrent metastatic urothelial carcinoma (CheckMate 032): a multicentre, open-label, two-stage, multi-arm, phase 1/2 trial*. Lancet Oncol, 2016. **17**(11): p. 1590-1598.
133. Ferris, R.L., et al., *Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression*. Oral Oncol, 2018. **81**: p. 45-51.
134. European Medicines Agency. *Opdivo - Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels*. 21.02.2020]; Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information_de.pdf).
135. Puntigam, L.K., et al., *Immune Checkpoint Expression on Immune Cells of HNSCC Patients and Modulation by Chemo- and Immunotherapy*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(15).
136. Gong, J., et al., *Radiation therapy and PD-1/PD-L1 blockade: the clinical development of an evolving anticancer combination*. J Immunother Cancer, 2018. **6**(1): p. 46.
137. Gatta, G., et al., *Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EURO CARE-5 population-based study*. Eur J Cancer, 2015. **51**(15): p. 2130-2143.
138. Lin, G., et al., *Prognostic significance of PD-L1 expression and tumor infiltrating lymphocyte in surgically resectable non-small cell lung cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(48): p. 83986-83994.
139. Lamberti, G., et al., *Clinicopathological and genomic correlates of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression in nonsquamous non-small-cell lung cancer*. Ann Oncol, 2020. **31**(6): p. 807-814.
140. Pawelczyk, K., et al., *Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological Factors and Diagnostic Markers*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(4).
141. Karatrasoglou, E.A., et al., *Association between PD-L1 expression and driver gene mutations in non-small cell lung cancer patients: correlation with clinical data*. Virchows Arch, 2020. **477**(2): p. 207-217.
142. Yang, W.F., et al., *The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis*. Oral Oncol, 2018. **86**: p. 81-90.

143. Parsa, A.T., et al., *Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 84-8.
144. Yoneda, K., et al., *Alteration in tumoural PD-L1 expression and stromal CD8-positive tumour-infiltrating lymphocytes after concurrent chemo-radiotherapy for non-small cell lung cancer*. Br J Cancer, 2019. **121**(6): p. 490-496.
145. Kelly, R.J., et al., *The Dynamic and Transient Immune Microenvironment in Locally Advanced Esophageal Adenocarcinoma Post Chemoradiation*. Ann Surg, 2018. **268**(6): p. 992-999.
146. Alexandrov, L.B., et al., *Signatures of mutational processes in human cancer*. Nature, 2013. **500**(7463): p. 415-21.
147. Samstein, R.M., et al., *Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types*. Nat Genet, 2019. **51**(2): p. 202-206.
148. Hellmann, M.D., et al., *Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden*. N Engl J Med, 2018. **378**(22): p. 2093-2104.
149. Kintsler, S., et al., *Expression of programmed death ligand (PD-L1) in different tumors. Comparison of several current available antibody clones and antibody profiling*. Ann Diagn Pathol, 2019. **41**: p. 24-37.
150. Lin, Y.M., et al., *High PD-L1 Expression Correlates with Metastasis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142656.
151. Hirsch, F.R., et al., *PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project*. J Thorac Oncol, 2017. **12**(2): p. 208-222.
152. Thomas, Y., et al., *Biologic functions of the OKT1 T cell surface antigen. I. The T1 molecule is involved in helper function*. J Immunol, 1984. **133**(2): p. 724-8.
153. Vassilakopoulou, M., et al., *Evaluation of PD-L1 Expression and Associated Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(3): p. 704-13.
154. Jiang, Y., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating immune cells and PD-L1 expression in esophageal squamous cell carcinoma*. Oncotarget, 2017. **8**(18): p. 30175-30189.
155. Lin, H., et al., *Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression*. J Clin Invest, 2018. **128**(2): p. 805-815.
156. Shi, F., et al., *PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients*. Int J Cancer, 2011. **128**(4): p. 887-96.
157. Erber, R., et al., *Comparison of PD-L1 mRNA Expression Measured with the CheckPoint Typer® Assay with PD-L1 Protein Expression Assessed with Immunohistochemistry in Non-small Cell Lung Cancer*. Anticancer Res, 2017. **37**(12): p. 6771-6778.
158. Coppock, J.D., et al., *Concordance levels of PD-L1 expression by immunohistochemistry, mRNA in situ hybridization, and outcome in lung carcinomas*. Hum Pathol, 2018. **82**: p. 282-288.

## APPENDIX

### I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Bcl-xL	B-cell lymphoma – extra large
CK2	Caseinkinase 2
CPS	Combined positive Score
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
HNSCC	Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs
IC-Score	Immune cell Score
IHC	Immunhistochemie
ITIM	immunrezeptor-tyrosinbasierendes-Inhibitionsmotiv
iTregs	induzierte regulatorische T-Zellen
ITSM	immunrezeptor-tyrosinbasierendes-Tauschmotiv
MHC I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex I/II
NSCLC	Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom
PD-L1+	PD-L1 positiv
PD-L1-	PD-L1 negativ
Pi3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
QuiP	Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie, QuIP-GmbH
RgMb	Repulsive guidance molecule B
SHP 1/2	Src homology region 2 domain containing phosphatase-1/2
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2
TCR	T-Zell-Rezeptor
TIL	tumorinfiltrierenden Lymphozyten
TIMC	tumorinfiltrierenden mononukleäre Zellen
TMA	Tissue-Microarray
TMB	Tumor-Mutations-Last
TPS	Tumor proportion score
ZAP70	Zeta-chain-associated protein kinase 70

## II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> Signalweg PD-1/PD-L1	<b>Seite 6</b>
<b>Abbildung 2:</b> Beispiel eines Stanzschemas	<b>Seite 14</b>
<b>Abbildung 3:</b> Beispiel einer PD-L1-Färbung mit dem Expressionsgrad 6h in verschiedenen Vergrößerungen	<b>Seite 17</b>
<b>Abbildung 4:</b> Beispiele verschiedener PD-1-Färbungen mit unterschiedlichen Ausprägungsgraden	<b>Seite 18</b>
<b>Abbildung 5:</b> Beispiele verschiedener CD5-Färbungen mit unterschiedlichen Ausprägungsgraden	<b>Seite 19</b>
<b>Abbildung 6:</b> Verteilung des Gesamtkollektivs nach Geschlecht und Lokalisation in absoluten Zahlen	<b>Seite 23</b>
<b>Abbildung 7:</b> Altersverteilung der Larynxkarzinompatienten des Kollektivs in absoluten Zahlen	<b>Seite 24</b>
<b>Abbildung 8:</b> Altersverteilung der Hypopharynxkarzinompatienten des Kollektivs in absoluten Zahlen	<b>Seite 24</b>
<b>Abbildung 9:</b> Lymphknotenstatus des Gesamtkollektivs nach Lokalisation geordnet in absoluten Zahlen	<b>Seite 25</b>
<b>Abbildung 10:</b> pT-Status der Tumore des Gesamtkollektivs nach Lokalisation geordnet in absoluten Zahlen	<b>Seite 26</b>
<b>Abbildung 11:</b> Differenzierungsgrad (Grading) der Tumore des Gesamtkollektivs nach Lokalisation geordnet in absoluten Zahlen	<b>Seite 26</b>
<b>Abbildung 12:</b> Verteilung der PD-L1-Expression im Gesamtkollektiv	<b>Seite 28</b>
<b>Abbildung 13:</b> Verteilung der PD-L1+ Fälle in den 6 Stufen des erweiterten Cologne-Scores	<b>Seite 28</b>
<b>Abbildung 14:</b> Verteilung der PD-L1+ Fälle im modifizierten Cologne-Score	<b>Seite 29</b>
<b>Abbildung 15:</b> Gesamtzahl und Verteilung der Patienten mit PD-1 positiven Lymphozyten in Abhängigkeit der PD-L1 Expression	<b>Seite 30</b>
<b>Abbildung 16:</b> Expression von PD-1 und CD5 in Lokalisation zum Tumorzellverband	<b>Seite 31</b>
<b>Abbildung 17:</b> Vergleich der Überlebenskurven in Abhängigkeit des PD-L1-Status in Monaten	<b>Seite 34</b>
<b>Abbildung 18:</b> Vergleich der Überlebenskurven in Abhängigkeit der prozentualen Anzahl PD-L1+ Zellen in Monaten	<b>Seite 35</b>
<b>Abbildung 19:</b> Verwendete Antikörper des QuIP aus dem Jahr 2019	<b>Seite 45</b>

### III TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b>	<b>Seite 7</b>
Inzidenzen der Larynx- und Hypopharynxkarzinome in den Jahren 2003, 2006, 2010, 2013 und 2016 für Männer (M) und Frauen (W)	
<b>Tabelle 2:</b>	<b>Seite 8</b>
Vergleich verschiedener Studien zur Expressionsrate von PD-L1 in HNSCC	
<b>Tabelle 3:</b>	<b>Seite 9</b>
Vergleich verschiedener Expressionsraten von PD-1 auf Lymphozyten bei HNSCC	
<b>Tabelle 4:</b>	<b>Seite 15</b>
Einteilung des erweiterten Cologne-Scores	
<b>Tabelle 5:</b>	<b>Seite 16</b>
Die 13 verschiedenen möglichen Ausprägungsgrade der PD-L1-Auswertung	
<b>Tabelle 6:</b>	<b>Seite 18</b>
Beispiele der Auswertung von PD-1 und CD5 anhand von drei Kollektivfällen	
<b>Tabelle 7:</b>	<b>Seite 39</b>
Statistischer und numerischer Vergleich der PD-L1 Expression gegenüber den verschiedenen Variablen des Kollektivs	
<b>Tabelle 8:</b>	<b>Seite 40</b>
Statistischer und numerischer Vergleich der prozentualen Anzahl PD-L1+ Zellen gegenüber den verschiedenen Variablen des Kollektivs	
<b>Tabelle 9:</b>	<b>Seite 42</b>
Korrelation nach Spearman zwischen dem erweiterten Cologne-Score und der Expression von CD5+i und CD5+p	
<b>Tabelle 10:</b>	<b>Seite 42</b>
Korrelation nach Spearman zwischen dem erweiterten Cologne-Score und der Expression von PD-1+i und PD-1+p	
<b>Tabelle 11:</b>	<b>Seite 42</b>
Korrelation nach Spearman zwischen der PD-L1 Färbeintensität und der Expression von CD5+i und PD-1+i	
<b>Tabelle 12:</b>	<b>Seite 43</b>
Korrelation nach Spearman zwischen CD5+p und PD-1+p und PD-1+i	
<b>Tabelle 13:</b>	<b>Seite 43</b>
Korrelation nach Spearman zwischen CD5+i und CD5+p, PD-1+p und PD-1+i	
<b>Tabelle 14:</b>	<b>Seite 47</b>
Übersicht über die in der EU zugelassenen Checkpoint-Inhibitoren gegen PD-1 und PD-L1	
<b>Tabelle 15:</b>	<b>Seite 50</b>
Therapieoptionen mittels Checkpoint-Inhibitoren gegen HNSCC in Abhängigkeit der PD-L1-Expression	
<b>Tabelle 16:</b>	<b>Seite 51</b>
Übersicht über die für die PD-1 IHC verwendeten Klone und Verdünnungen der in dieser Arbeit zitierten Studien	
<b>Tabelle 17:</b>	<b>Seite 54</b>
Vergleich statistischer Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu den Ergebnissen von Müller et al. und Schneider et al. im Hinblick auf Zusammenhänge zwischen einer	

positiven PD-L1-Expression und Tumormerkmalen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs