

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Morphomolekulare Analyse des Immun-Mikromilieus im Kopf-
Hals-Karzinom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mohamed Badr
aus Gharbeya, Ägypten

Datum der Promotion: 17.09.2021

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abbildungsverzeichnis	3
Abkürzungen.....	4
Abstract	5
Zusammenfassung	6
1 Einleitung	7
2 Methodik	12
2.1 Studienkohorte	12
2.2 TILs Quantifizierung.....	12
2.3 Molekulare Tumorparameter	13
2.4 Statistische Datenanalyse	14
3 Ergebnisse	15
3.1 Immunologische und klinisch-pathologische Tumoreigenschaften.....	15
3.2 Univariate Überlebensanalyse.....	17
3.3 Multivariate Überlebensanalyse.....	17
3.4 Korrelationsanalyse.....	19
4 Diskussion.....	21
Quellenverzeichnis.....	29
Eidesstattliche Versicherung	35
Anteilerklärung	36
ISI-Web-Liste.....	37
Publikation	40
Lebenslauf	53
Publikationsliste.....	54
Danksagung.....	55

Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abbildung 1: Bewertung und Klassifizierung von ieTILs und strTILs im HNSCC.	13
Abbildung 2: Abhängigkeit der Immunzelleninfiltrate und Gewebebiomarker vom HPV-Status und Gewebetyp	16
Abbildung 3: Immunzellinfiltrate als positiver prognostischer Marker für HNSCC (TCGA-Kohorte)..	19
Abbildung 4: Beziehung zwischen TILs, T-Zell-Häufigkeit und PD-L1-mRNA-Expression in HNSCC (TCGA-Kohorte)	20

Abkürzungen

CD274	Programmierter Zelltod 1 ligand 1, programmed cell death 1 Ligand 1
DFS	Krankheitsfreies Überleben, Disease-free survival
FDA	Food and Drug Administration
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNSCC	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HR	Hazard ratio
HPV	Humanes Papillomavirus, Human Papilloma Virus
OS	Gesamtüberleben, Overall Survival
OTSCC	Mund-Zungen-Plattenepithelkarzinom, Oral tongue squamous cell carcinoma
ORR	Objektive Ansprechrage, Objective Response Rate
strTILs	Stromale TILs, stromal TILs
PDCD1	Programmierter Zelltod 1, programmed cell death 1
TILs	Tumordinfiltrierende Lymphozyten, tumor infiltrating lymphocytes
ieTILs	Intraepitheliale TILs, intra-epithelial TILs
TME	Tumormikromilieu, Tumor Microenvironment

Abstract

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer worldwide. Risk factors include smoking, alcohol consumption and human papillomavirus (HPV) infection. Early staged diagnosed patients are treated with surgery or radiotherapy and show 50-60% survival in a 5 years follow-up. Recurrent or metastatic HNSCC has a poor prognosis. The FDA has approved anti-PD-1 immune checkpoint inhibitors nivolumab and pembrolizumab as a treatment of patients with recurrent squamous cell carcinoma of HNSCC. Pembrolizumab is indicated as adjuvant and neoadjuvant, alone or in combination with chemotherapy or radiation.

To gain insight in the composition of the tumor microenvironment, we examined all available digital HE slides of the TCGA HNSCC cohort. We developed a semi-quantitative method for the evaluation of tumor infiltrating lymphocytes (TILs). Based on this method we classified intra-epithelial TILs (ieTILs) as present or absent and stromal TILs (strTILs) as high or low. Correlation between ieTILs and strTILs was positive and significant ($p < 0.001$), but the assessments considered only in a limited portion (60.8%) of the tumors. The abundance of T cells was estimated from the expression of marker genes in RNAseq data.

A higher abundance of ieTILs and T cells was detected in HPV+ tumors compared to HPV- tumors (76.8% vs. 58.2%, $p = 0.01$ and 69.1% vs. 45.7%, $p < 0.001$). Tumors with high T cells had a significantly better DFS (HR=0.8, $p = 0.03$) as well as a significantly better OS (HR=0.82, $p = 0.001$) compared to tumors with low T cells. Tumors with detectable ieTILs had a better DFS (HR=0.66, $p = 0.015$) compared to tumors without ieTILs. PD-L1 expression correlated significantly with the level of T cell infiltration ($R = 0.44$, $p = 1e-22$), but not with DFS or OS.

In summary, the main interest of this work is to show the importance of immunological biomarkers as prognostic factors. Intra-epithelial TIL and stromal TIL abundance should be evaluated separately. The immune markers studied here should be examined in cohorts of immunotherapeutic patients for their predictive importance in future studies.

Zusammenfassung

Das Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom (HNSCC) ist der sechsthäufigste Tumor weltweit. Risikofaktoren sind Rauchen, Alkoholkonsum und die Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV). Frühzeitig diagnostizierte Patienten werden mit chirurgischen Eingriffen oder Strahlentherapien behandelt und weisen in den folgenden 5 Jahren eine Überlebensrate von 50–60 % auf. Das rezidivierende oder metastasierte HNSCC hat eine schlechte Prognose. Die FDA hat die Anti-PD-1-Immun-Checkpoint-Hemmer Nivolumab und Pembrolizumab zur Behandlung von Patienten mit rezidivierendem Plattenepithelkarzinom des HNSCC zugelassen. Pembrolizumab wird als Adjuvans und Neoadjuvans allein oder in Kombination mit Chemotherapie oder Bestrahlung angewendet.

Um Einblicke in die Zusammensetzung des Tumormikromilieus zu gewinnen, haben wir alle verfügbaren digitalen HE-Objektträger der TCGA-HNSCC Kohorte untersucht. Mit Hilfe eines semiquantitativen Verfahrens zur Auswertung tumorinfiltrierender Lymphozyten (TILs) analysierten wir das Vorhandensein oder die Abwesenheit intraepithelialer TILs (ieTILs) und den Zustand hoher und niedriger Abundanz stromaler TILs (strTILs) in unseren klinisch-pathologischen Kohorten. Die Korrelation zwischen ieTILs und strTILs war positiv und hoch signifikant ($p < 0,001$), die Übereinstimmung der beiden Marker war mit 60,8 % jedoch beschränkt. Die Abundanz von T-Zellen im Tumormikromilieu wurde anhand von RNAseq-Daten geschätzt.

Bei HPV-positiven Tumoren wurden im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren häufiger ieTILs und T-Zellen festgestellt (76,8 % vs. 58,2 %, $p = 0,01$ und 69,1 % vs. 45,7 %, $p < 0,001$). Tumoren mit hoher Abundanz von T-Zellen hatten ein signifikant besseres DFS (HR = 0,8; $p = 0,03$) sowie ein signifikant besseres OS (HR = 0,82; $p = 0,001$) im Vergleich zu Tumoren mit niedriger T-Zell Infiltration.

Tumoren mit nachweisbaren ieTILs hatten ein besseres DFS (HR = 0,66; $p = 0,015$) im Vergleich zu Tumoren ohne ieTILs. Die PD-L1-Expression korrelierte signifikant mit dem Ausmaß der T-Zell-Infiltration ($R = 0,44$; $p = 1e-22$), aber nicht mit DFS oder OS.

Zusammenfassend gilt das Hauptinteresse dieser Arbeit der Bedeutung immunologischer Biomarker als Prognosefaktoren. Die Verfügbarkeit intraepithelialer TILs und stromaler TILs muss separat bewertet werden. In zukünftigen Studien sollten die hier untersuchten Immunmarker in Kohorten immuntherapierter Patienten im Hinblick auf ihre prädiktive Bedeutung untersucht werden.

1 Einleitung

Die Charakteristik von Krebszellen umfasst zehn biologische Eigenschaften, die während der mehrstufigen Entwicklung von menschlichen Tumoren erworben werden. Sie umfassen die Aufrechterhaltung des proliferativen Signals, die Umgehung von Wachstumsstoppnern, die Abwehr des Zelltods, die Ermöglichung der replikativen Unsterblichkeit, die Induktion der Angiogenese und die Aktivierung der Invasion und Metastasierung [1].

Die Krebsimmuntherapie basiert darauf, dass Tumorzellen als nicht-körpereigene Zellen erkannt werden. Dadurch können sie von einem aktivierten Immunsystem effektiv angegriffen werden [2].

Mit Hilfe von antigenpräsentierenden Zellen werden Tumorzellen vom Immunsystem erkannt. Sie ermöglichen die Erkennung von eingedrungenen Erregern oder veränderten Körperzellen und leiten so deren wirkungsvolle Beseitigung durch eine spezifische Immunantwort ein. Dabei hat die Antigenpräsentation eine wesentliche Funktion. Sie kann die Aktivierung von T-Lymphozyten auslösen.

Eine Bindung von PD-L1 an PD-1 hemmt die Immunantwort. PD-L1 wird von manchen Tumoren verstärkt gebildet. Eine erhöhte Transkription der Zytokine IL-1a, IL-10, IL-27 und IL-32g zusätzlich zu IFN-g ist mit der PD-L1-Proteinexpression assoziiert. Einige Zytokine wie IL-1a und IL-27 können in Kombination mit IFN-g eine additive oder synergistische Wirkung auf die PD-L1-Expression haben. Eine hohe Konzentration an PD-L1 in soliden Tumoren ist ein negativer Prognosemarker z. B. in Melanomen [3].

HNSCC ist eine immunsuppressive Erkrankung mit einer niedrigeren absoluten Lymphozytenzahl, einer beeinträchtigten Aktivität der natürlichen Killerzellen (NK) und einer schlechteren Antigenpräsentationsfunktion als bei gesunden Probanden [4][5][6][7][8]. Die Beeinträchtigung von Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten hat einen starken Einfluss auf das klinische Ergebnis [9]. Zusätzlich wurden suppressive regulatorische T-Zellen (Tregs) im Tumormikromilieu mit dem Fortschreiten des HNSCC-Tumors in Verbindung gebracht [10]. Das Vorhandensein von CD8+-Lymphozyten in der Tumormikroumgebung wurde mit einer besseren Prognose bei vielen Tumorarten, zum Beispiel beim kolorektalen Karzinom (CRC) und auch bei anderen soliden Krebsarten, in Verbindung gebracht. Diese sind derzeit auch ein wichtiges Ziel neuer Behandlungsstrategien [11].

Das Vorhandensein von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) hat sich kürzlich als prognostischer Biomarker bei mehreren soliden Tumorarten herausgestellt. Die Quantifizierung und

Subtypisierung von TILs spiegelt die Immunantwort in der Tumormikroumgebung wieder [12]. Das Vorhandensein von TILs im TME ist häufig mit einem klinischen Ansprechen auf die adjuvante Therapie verbunden [13][14][15].

HPV-positive Tumoren im Kopf- und Halsbereich stellen aufgrund ihrer intrinsischen Immunogenität und der zusätzlichen Immunantwort, die als Reaktion auf das Virus selbst ausgelöst wird, ein besonders attraktives Ziel für die Krebsimmuntherapie dar. HPV-positive Tumoren überexprimieren E6 und E7, die vom Immunsystem als nicht-selbst-Antigene erkannt werden. Daher sind HPV-positive Tumore ideale Ziele für impfstoffbasierte Immuntherapien [16][17].

Diese Immuntherapien fallen in verschiedenen Klassen, darunter Checkpoint-Inhibitoren, Lymphozyten-aktivierende Zytokine, CAR-T-Zellen und andere Zelltherapien, agonistische Antikörper gegen co-stimulierende Rezeptoren, Krebsimpfstoffe, onkolytische Viren sowie bispezifische Antikörper [18]. Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) sind monoklonale Antikörper, die auf das cytotoxische T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4), das programmierte Zelltod-Protein-1 (PD-1) oder den PD-1-Liganden (PD-L1) abzielen. Es gibt mehrere Studien zu verschiedenen Stufen der HNSCC-Abgrenzung unter Verwendung von Kombinationen der Immun-Checkpoint-Inhibitoren mit Chemotherapie oder Strahlentherapie [19][20]. ICI sind für die Behandlung von bösartigem Melanom, nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, klassischem Hodgkin-Lymphom, Plattenepithelkarzinom in Kopf und Hals, Urothelkarzinom und Nierenzellkarzinom zugelassen. Ipilimumab, Tremelimumab, Pembrolizumab, Nivolumab, Atezolizumab, Durvalumab und Avelumab sind Beispiele für ICI. Beispiele für gute Gesamtansprechraten (ORR) sind der nicht-kleinzellige Lungenkrebs (NSCLC) (15 %) und HNSCC (12 %–25 %)[21].

Im Jahr 2012 führten Topalian et al. eine große zulassungsrelevante Phase-1-Nivolumab-Studie durch, an der Patienten mit verschiedenen fortgeschrittenen soliden Tumoren teilnahmen. Diese Studie zeigte einen Effekt der PD-L1-Immuntherapie bei Melanomen, Nierenzellkarzinomen (RCC) und NSCLC, während bei metastasiertem kastrationsresistentem Prostatakrebs und metastasiertem Kolorektalkarzinom (mCRC) keine Aktivität beobachtet wurde. Von den getesteten Patienten exprimierten 60 % der Tumoren > 5 % PD-L1. Die Patienten mit > 5 % PD-L1-Expression hatten eine Gesamtansprechraten von 36 % im Vergleich zu den Patienten mit negativer PD-L1-Expression, die eine Gesamtansprechraten von 0 % hatten [22]. Die von den Tumorzellen erworbenen Mutationen verändern häufig die Proteinfunktion und Expression, was zur Bildung von Neoantigenen führt. Sie werden auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimiert. T-Zellen erkennen diese Neoantigene und lösen eine Antitumorreaktion aus. Daher spielt

die durch eine hohe Mutationslast vermittelte Neoantigenlast eine Schlüsselrolle bei Antitumorimmunreaktionen.

Nivolumab (Opdivo), ein weiterer PD-1-Immun-Checkpoint-Hemmer, ist von der FDA als Monotherapie zur Behandlung von rezidivierendem oder metastasiertem HNSCC, die nach einer platinbasierten Chemotherapie Rezidiv gezeigt haben, zugelassen. Diese Zulassung basierte auf Daten aus der CheckMate 141-Studie (NCT02105636). Die Daten zeigten, dass Patienten mit Fortschreiten der Erkrankung nach einer platinbasierten Chemotherapie ein signifikant längeres OS (7,5 Monate) mit Nivolumab als mit einer Standardtherapie (5,1 Monate; HR 0,70; 95%-KI, 0,53–0,92) besaßen. Die Europäische Kommission genehmigte 2017 Nivolumab zur Behandlung der gleichen Patientenpopulation und kurz danach Pembrolizumab-Monotherapie zur Behandlung des rezidivierenden oder metastasierten HNSCC bei Erwachsenen, deren Tumoren PD-L1 in $\geq 50\%$ der Tumorzellen exprimieren und während oder nach einer platinhaltigen Chemotherapie fortgeschritten sind. Erste Ergebnisse für die Phase-3-KEYNOTE-048-Studie (NCT02358031) zur Untersuchung von Pembrolizumab als Erstlinientherapie zur Behandlung von Patienten mit rezidivierten und metastasierten (R/M) HNSCC wurden auf dem Kongress der Europäischen Gesellschaft für Medizinische Onkologie (ESMO) 2018 vorgestellt. Im Februar 2019 genehmigte die FDA einen neuen Zulassungsantrag für Pembrolizumab als Monotherapie oder in Kombination mit Platin und 5-Fluorouracil (5-FU) für die Erstbehandlung von Patienten mit rezidivierendem oder metastasiertem HNSCC [23]. Vor Kurzem wurde von der FDA ein Anti-Programmed-Death-1-Wirkstoff zur Behandlung von Patienten mit rezidivierendem oder metastasierendem HNSCC mit Fortschreiten der Krankheit während oder nach einer platinbasierten Therapie zugelassen [23]. Dieser zeigte eine dauerhafte objektive Ansprechrate mit einem guten Sicherheitsprofil und einer guten Lebensqualität.

Obwohl die Immuncheckpointblockade im HNSCC vielversprechende Ergebnisse gezeigt hat, ist der Prozentsatz der darauf ansprechenden Tumore sehr begrenzt.

In der KEYNOTE-012-Studie wurde die Immuntherapie mit PD-1 und PD-L1-Inhibitor Pembrolizumab in R/M HNSCC untersucht. In dieser Multikohorten-Phase-I-Studie erhielten 132 Patienten mit R/M-HNSCC Pembrolizumab. Die objektive Ansprechrate betrug 18 %. Die Reaktionen wurden unabhängig vom HPV-Status der Patienten beobachtet. Die Ergebnisse von KEYNOTE-012 wurden in der KEYNOTE-055-Studie bestätigt, einer Phase-II-Studie, die sich ausschließlich auf Patienten mit Progression einer Erkrankung an R/M-HNSCC nach der Behandlung mit Platin und Cetuximab konzentrierte. In dieser Studie erhielten 171 Patienten Pembrolizumab. Die allgemeine Ansprechrate in dieser stärker vorbehandelten Gruppe betrug

16 %. Während diese Daten für die Minderheit der Patienten, die auf Immuntherapie ansprechen, sehr interessant sind. Über 80 % der Patienten mit metastasierendem HNSCC sprachen nicht auf die PD-1-Blockade an. Es gibt zwei Schlüsselwege, um die Ergebnisse der Immuntherapie im HNSCC zu verbessern :rationale kombinierte Immuntherapieansätze und verbesserte Biomarker, um die Patientenauswahl zu unterstützen [24].

Sowohl Nivolumab als auch Pembrolizumab sind für die Behandlung von Patienten mit R/M-HNSCC mit Fortschreiten der Erkrankung während oder nach einer platinbasierten Therapie zugelassen, ohne dass ein Biomarker-Test erforderlich ist. Dies unterstreicht die Bedeutung der Entwicklung prädiktiver Biomarker, um besser bestimmen zu können, wer von der Behandlung mit Anti-PD-1/PD-L1-ICIs profitieren wird. Spezifische prognostische Biomarker, die im HNSCC evaluiert wurden, umfassen die Expression von PD-L1, die Tumormutationslast (TMB) und die Immungensignaturen sowohl im Tumor als auch im umgebenden Gewebe. Mit dem Nachweis, dass sich die PD-L1-Positivität für Populationen mit klinischem Nutzen anreichert, wurde der bisher größte Schwerpunkt auf die PD-L1-Expression im Tumor und in verschiedenen Immunzellen gelegt. Die Identifizierung anderer prädiktiver Biomarker ist jedoch erforderlich, um das Ansprechen bei größeren Patientenpopulationen zu verbessern [23].

In Verbindung mit dem Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab wurden zwei biologisch wichtige Biomarker, PD-L1 und Mismatch Repair Deficiency, von der FDA zugelassen. Die Tumormutationslast (TMB), ein weiterer vielversprechender Biomarker, tritt bei mehreren Tumorarten auf und wird möglicherweise bald auch genehmigt. TMB ist ein gutes Maß für die Beurteilung der Neoantigenlast, ist einfach zu messen und in der Klinik anzuwenden. Obwohl nicht alle Mutationen zu Tumor-immunogenen Peptiden führen können, beeinflusst ihre Anzahl die Menge der möglicherweise produzierten Neoantigene. Somit kann TMB entweder als Prädiktor für den klinischen Nutzen oder als Prognosefaktor dienen. Kürzlich haben Yarchoan et al. die Daten aus mehreren klinischen Studien mit PD-1 und PD-L1 analysiert und fanden eine signifikante Korrelation zwischen TMB und der objektiven Ansprechrate ($p < 0,001$) auf die Immuntherapie bei 27 soliden Tumortypen [25].

In der hier vorgelegten Studie kombinierten wir die histomorphologische Bewertung und molekulare Analyse der Immunmikroumgebung in der TCGA-HNSCC-Kohorte. Durch Analyse digitaler HE-gefärbter Objektträger wurde eine Methode zur Klassifizierung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) im intraepithelialen Kompartiment (ieTILs, vorhanden vs. nicht vorhanden) und im Stromakompartiment (strTILs, hoch vs. niedrig) etabliert. Zusätzlich wurde

unter Verwendung der Bioinformatik-Methode MCP-counter die Häufigkeit von acht spezifischen Immunzellpopulationen aus RNAseq-Daten geschätzt [26]. TIL-Status, Immunzellpopulationen und PD-L1-mRNA-Expressionslevel wurden auf Korrelation mit klinisch-pathologischen Tumoreigenschaften und Überleben untersucht.

2 Methodik

2.1 Studienkohorte

Unsere Studienkohorte bestand aus 518 therapienaiven HNSCC-Tumoren, die im Rahmen des TCGA-Projekts profiliert wurden. Für 451 Tumoren standen digitalisierte, HE-gefärbte Schnitte und für 510 Tumoren Genexpressionsdaten zur Verfügung. Die klinischen Daten der Tumoren wurden vom GDAC Firehose-Portal (gdac.broadinstitute.org) heruntergeladen. Die molekularen Daten wurden vom cBioPortal (www.cbioportal.org) heruntergeladen. Die digitalen Objektträger wurden online (cancer.digitalslidearchive.net) angezeigt und ausgewertet. Der HPV-Status der Tumoren (96 HPV+, 420 HPV– und 2 intermediäre/unbekannte Fälle) war aus der Tabelle der klinischen Daten ersichtlich. Die Proben wurden unter Verwendung einer empirischen Definition von > 1000 kartierten RNA-Sequenzierungs- (RNA-Seq) Reads als HPV+ klassifiziert, wobei hauptsächlich die viralen Gene E6 und E7 angeglichen wurden, wie in der entsprechenden TCGA-Veröffentlichung beschrieben.

2.2 TILs Quantifizierung

Digitale HNSCC-Objektträger wurden auf das Vorhandensein von intraepithelialen TILs (ieTILs) und stromalen TILs (strTILs) untersucht. Die Konzentration beider Arten von TILs wurde getrennt semiquantitativ bewertet und in die vier Dichten "abwesend", "niedrig", "mittel" und "hoch" eingeteilt (Abb. 1c-f). Dabei wurde der gesamte Gewebeschnitt ausgewertet und in Regionen unterteilt, die in Bezug auf den Grad der TIL-Infiltration homogen waren. Entsprechend den vier Dichten der TIL-Infiltration erhielten wir vier Prozentwerte x_1 , x_2 , x_3 und x_4 , die sich zu 100 % der Tumorbereiche (ieTILs) bzw. der Stromabereiche (strTILs) aufsummieren. Anschließend wurde die Gesamtzahl der ieTILs und der strTILs mit der Formel $S = (0 \cdot x_1 + 1 \cdot x_2 + 2 \cdot x_3 + 4 \cdot x_4) / 4$ berechnet. Die Punkte der ieTILs und die Punkte der strTILs zeigten klare bimodale Verteilungen. Daher führten wir Cut-Off-Punkte ein, um die beiden Verteilungsmoden zu trennen, und analysierten beide Marker als binäre Variablen: Für ieTILs führten wir einen Trennpunkt von 0 ein, um Fälle mit intraepithelialen TILs ($n = 277$) von Fällen ohne intraepitheliale TILs ($n = 176$) zu trennen (Abb. 1a). Für strTILs haben wir einen Cut-Off-Punkt von 40 eingeführt, um Fälle mit einer hohen Anzahl an strTILs ($n = 236$) von Fällen mit einer niedrigen Anzahl an strTILs ($n = 215$) zu trennen (Abb. 1b).

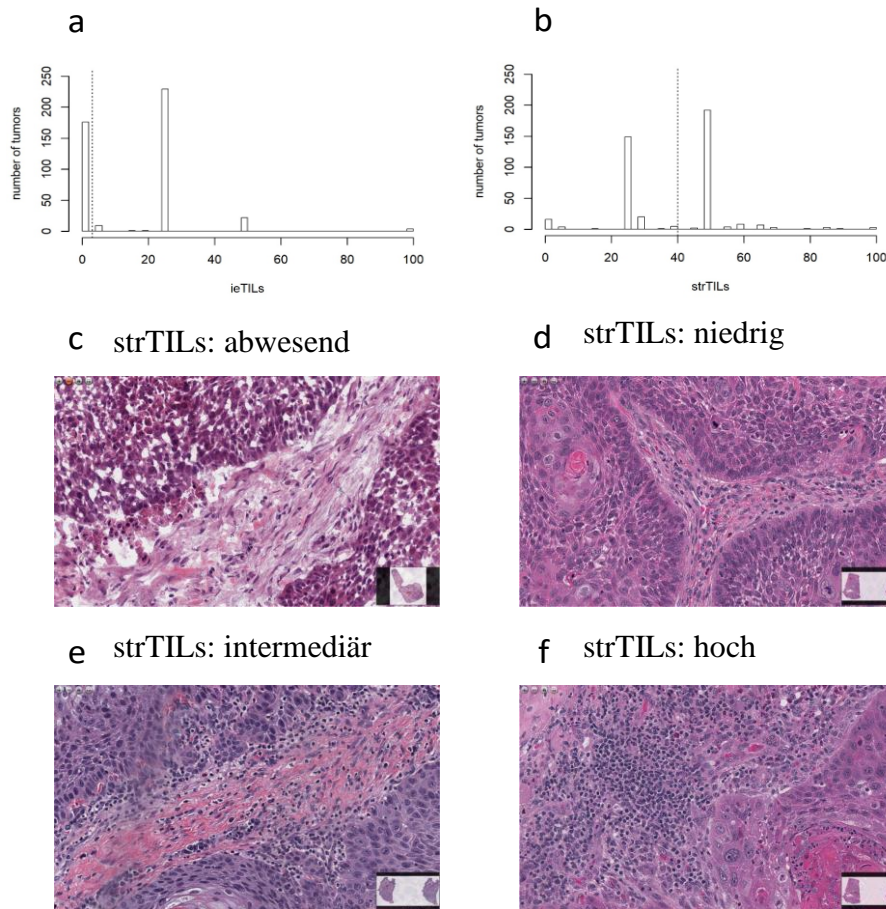


Abbildung 1: Bewertung und Klassifizierung von ieTILs und strTILs im HNSCC. TILs wurden mit $S = (0 \cdot x_1 + 1 \cdot x_2 + 2 \cdot x_3 + 4 \cdot x_4) / 4$ bewertet, wobei x_1 , x_2 , x_3 und x_4 die Anteile mit fehlender, niedriger, mittlerer und hoher TIL-Dichte im Tumorkompartiment darunter waren berücksichtigt ($x_1 + x_2 + x_3 + x_4 = 100\%$). **a** Einteilung in "ieTIL vorhanden" ($S > 0$) und "ieTILs nicht vorhanden" ($S = 0$) Tumoren. **b** Einteilung in „strTIL high“ ($S \geq 40$) und „strTIL low“ ($S < 40$) Tumoren. **c-f** Repräsentative Beispiele für Tumorregionen mit fehlender, niedriger, mittlerer und hoher strTIL-Dichte (Ausschnitte von digitalen Objektträgern aus TCGA-HNSCC).

2.3 Molekulare Tumorparameter

Die Abundanz zehn verschiedener Zellpopulationen in der Tumor-Mikroumgebung (T-Zellen, CD8-T-Zellen, zytotoxische Lymphozyten, B-Zellen, NK-Zellen, monozytische Linie, myeloide dendritische Zellen, Neutrophile, Endothelzellen und Fibroblasten) wurde aus RNA-seq-Daten mittels des Algorithmuses MCP-counter [26] geschätzt. Für einige der Analysen wurden Zellpopulationen und PD-L1-mRNA-Expression unter Verwendung des Medianwerts als Cut-Off-Punkt dichotomisiert ("hoch" vs. "niedrig").

Die zytolytische Aktivität (CYT) wurde als Mittelwert der GZMA- und PRF1-Expression definiert. Die Tumormutationslast (TMB) wurde berechnet als die Anzahl der exonischen, nicht-synonymen somatischen Mutationen in den WES-Daten (eingeschlossene Variantenklassen: Missense_Mutation, Nonsense_Mutation, Frame_Shift_Del, Frame_Shift_Ins, In_Frame_Del, In_Frame_Ins, Translation_Start_Site_Site, Nonstop_Ins). Die klonale Diversität wurde durch die Mutanten-Alleltumor-Heterogenität (MATH) quantifiziert mittels der bioinformatischen Methode.

2.4 Statistische Datenanalyse

Die statistische Modellierung und die Berechnung der p-Werte wurde mit SPSS 25 durchgeführt. Korrelationen der molekularen Parameter mit den klinisch-pathologischen Kohorteneigenschaften wurden mittels des Fisher-Tests und des Welch-t-Tests auf Signifikanz getestet. Eine univariate Überlebensanalyse wurde unter Verwendung von Kaplan-Meier-Kurven, Cox-Proportional-Hazard-Modellen und dem Log-Rank-Test durchgeführt. Bivariate und multivariate Überlebensanalysen wurden mit Cox-Proportional-Hazard-Modellen und dem Wald-Test durchgeführt. Die multivariate Überlebensanalyse umfasste die Korrektur für Alter (kontinuierliche Variable), HPV-Status, Raucherstatus, Tumorstadium (Stadien I-III vs. IV), Tumorgrad (G1/G2 vs. G3/G4) und Tumorlokalisation (kategoriale Variablen). Zwei Abbildungen wurden unter Verwendung der statistischen Sprache R erzeugt. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Die Studienkohorte bestand aus 518 nicht-vorbehandelten primären HNSCC. Der HPV-Status war bei 96 Tumoren positiv, bei 420 Tumoren negativ und konnte bei zwei Tumoren nicht bestimmt werden. Für die statistische Analyse wurden die Tumorstadien in I-III oder IV, der Tumorgrad wurde in G1/G2 oder G3/G4 und die Tumortopographie in zwei Hauptlokalisationen (lymphoepitheliale Gewebe oder andere Gewebe) eingeteilt. lymphoepitheliale Gewebe (Mandel und Zungengrund) zeigten die höchste TIL-Infiltration aller Lokalisationen. Die TIL-Bewertung war für 451 Tumoren möglich, für die HE-Objektträger verfügbar waren. TILs wurden getrennt im intraepithelialen Kompartiment (vorhanden vs. nicht vorhanden) und im Tumorstroma (hoch vs. niedrig) ausgewertet. RNA-Seq-Daten lagen für 510 Tumoren vor und wurden verwendet, um die Abundanz von zehn Zellpopulationen (Endothelzellen, Fibroblasten und acht Arten von Immunzellen) in der Tumormikroumgebung zu quantifizieren.

3.1 Immunologische und klinisch-pathologische Tumoreigenschaften

Intraepitheliale TILs (ieTILs) waren in 277 Tumoren (61,4 %) vorhanden und stromale TILs (strTILs) waren in 236 Fällen (52,3 %) hoch. Die Korrelation zwischen ieTILs und strTILs war positiv und hoch signifikant ($p < 0,001$). Die Bewertung von ieTILs und strTILs stimmte in 274 Fällen (60,8 %) überein. Andererseits waren in 109 Fällen (24,2 %) ieTILs vorhanden, während strTILs niedrig waren und in 68 Fällen (15,1 %) waren strTILs hoch, während ieTILs fehlten. Eine signifikante Assoziation von ieTILs und strTILs wurde auch in der Untergruppe der HPV-negativen Tumoren beobachtet (62,3 %, $p < 0,001$), jedoch nicht in der Untergruppe der HPV-positiven Tumoren (Koinzidenz = 51,5 %).

Wir korrelierten den ieTILs, strTILs, T-Zellen und PD-L1-Status mit den klinisch-pathologischen Kohortenmerkmalen. In HPV-positiven Tumoren wurde eine höhere Abundanz von ieTILs und T-Zellen als in HPV-negativen Tumoren gefunden (76,8 % vs. 58,2 %; $p = 0,01$ und 69,1 % vs. 45,7 %, $p < 0,001$), während die Häufigkeit von strTILs nicht mit dem HPV-Status assoziiert war. und die Höhe der PD-L1-Expression nicht mit dem HPV-Status assoziiert war (Abb. 2a).

T-Zellen korrelierten signifikant ($p < 0,0001$) mit der Tumorlokalisation, während für ieTILs, strTILs und PD-L1-mRNA keine signifikanten Korrelationen mit der Tumorlokalisation beobachtet wurden. Insbesondere war die Infiltration mit T-Zellen bei Tumoren in den lymphoepithelialen Geweben (Tonsille und Zungengrund) häufig höher als in anderen Geweben (78.1% vs. 46.3%, $p < 0,001$, Abb. 2b).

Die PD-L1-mRNA wurde im Vergleich zu rauchenden Patienten häufiger bei Nichtrauchern hoch exprimiert (58,8 % gegenüber 45,6 %, $p = 0,005$). Tumoren im niedrigen Stadium (I-III) wiesen im Vergleich zu fortgeschrittenem Stadium IV häufiger eine hohe Abundanz von strTILs (59,9% vs. 47,4%, $p = 0,01$) und häufiger eine hohe PD-L1-mRNA-Expression (55,8 % vs. 46,3 %, $p = 0,046$) auf. Das Vorhandensein von ieTILs und hohe Konzentrationen von T-Zellen korrelierten positiv mit einem hohen Tumorgrad ($p = 0,025$ und $p = 0,04$).

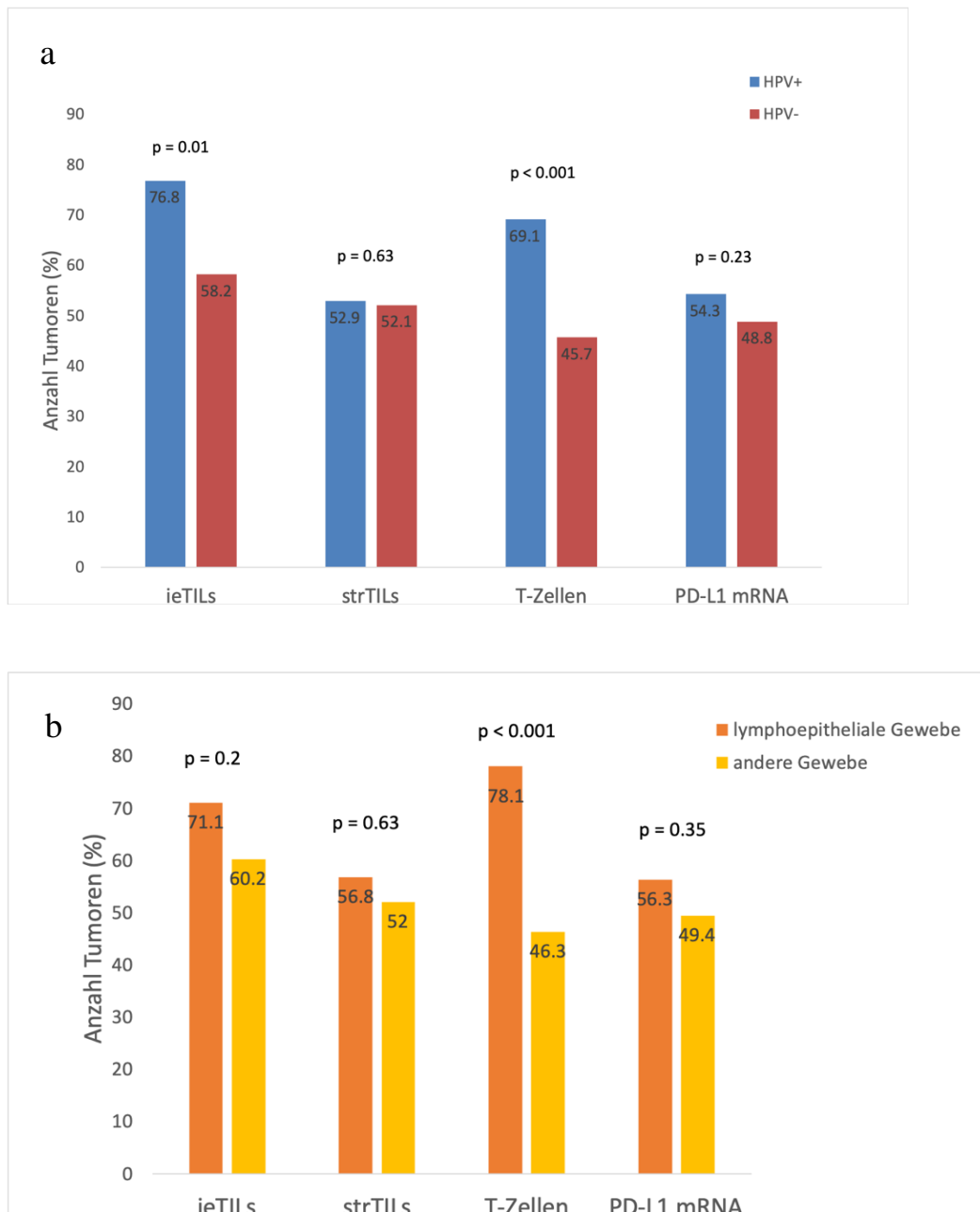


Abbildung 2: Abhängigkeit der Immunzelleninfiltrate und Gewebemarkern vom HPV-Status und Gewebetyp. **a** Prozentzahl der positiven Fälle bei HPV+ Tumoren im Vergleich zu HPV- Tumoren. **b** Prozentzahl der positiven Fälle bei Tumoren in lymphoepitheliale Gewebe (Tonsille und Zungengrund) im Vergleich zu Tumoren der anderen Gewebe (Pharynx, Larynx, Mund, andere Teile der Zunge). ieTILs = inter-epitheliale tumorinfiltrierende Lymphozyten. strTILs = stromale tumorinfiltrierende Lymphozyten.

3.2 Univariate Überlebensanalyse

Als nächstes analysierten wir die prognostischen Auswirkungen des ieTIL-, TIL-, T-Zellen- und PD-L1-Status (Abb. 3). Tumoren mit hoher Anzahl an T-Zellen hatten ein signifikant besseres DFS (HR = 0,8; $p = 0,03$) sowie ein signifikant besseres OS (HR = 0,82; $p = 0,001$) im Vergleich zu Tumoren mit niedriger Anzahl an T-Zellen. Tumoren mit nachweisbaren ieTILs hatten ein besseres DFS (HR = 0,66; $p = 0,015$) im Vergleich zu Tumoren ohne ieTILs, aber die Auswirkung auf das OS war nicht signifikant. Weder der strTIL-Status noch der PD-L1-Status waren mit einem signifikanten Unterschied des DFS oder OS verbunden.

Wir untersuchten weiterhin die prognostische Relevanz der Immunmarker, wobei HPV-negative und HPV-positive Tumoren separat betrachtet wurden. Intraepitheliale TILs blieben dabei ein positiver Prognosefaktor für DFS in der HPV- Untergruppe (HR = 0,68; $p = 0,04$), jedoch nicht in der HPV+ Untergruppe. Stromale TILs zeigten keine prognostische Bedeutung bei HPV- oder HPV+ Tumoren. Hohe T-Zellwerte waren bei HPV+ Tumoren positiv mit DFS und OS assoziiert (HR = 0,2; $p = 0,001$ und HR = 0,21 $p < 0,001$) und zeigten einen Trend zu besserem OS bei HPV- Tumoren (HR = 0,79; $p = 0,1$).

Darüber hinaus analysierten wir die prognostische Bedeutung von 14 kontinuierlichen Variablen, einschließlich der Niveaus von zehn spezifischen Zellpopulationen, die durch MCP-Counter [19] geschätzt wurden. Die meisten Immunzellpopulationen waren positive Prognosemarker bei HNSCC, sowohl bei HPV- Tumoren als auch bei HPV+ Tumoren. Unter diesen waren T-Zellen die signifikantesten Marker in der gesamten HNSCC Kohorte (DFS: HR = 0,8; $p = 0,003$; OS: HR = 0,82; $p < 0,001$). T-Zellen waren auch in HPV-positiven Tumoren signifikant prognostisch (DFS: HR = 0,65; $p = 0,004$; OS: HR = 0,58; $p < 0,001$), jedoch nicht in HPV-negativen Tumoren. Hohe zytolytische Aktivität (CYT) und PD-L1-mRNA waren positive Prognosemarker im HPV-positiven HNSCC, jedoch nicht in der gesamten HNSCC Kohorte und nicht in HPV-negativen HNSCC. Die Abundanz von Endothelzellen war ein positiver Prognosefaktor bei HPV-negativen HNSCC (DFS: HR = 0,67; $p = 0,002$; OS: HR = 0,83; $p = 0,08$), aber ein negativer Prognosefaktor bei HPV-positiven HNSCC (DFS: HR = 1,7; $p = 0,09$; OS: HR = 2,06; $p = 0,01$).

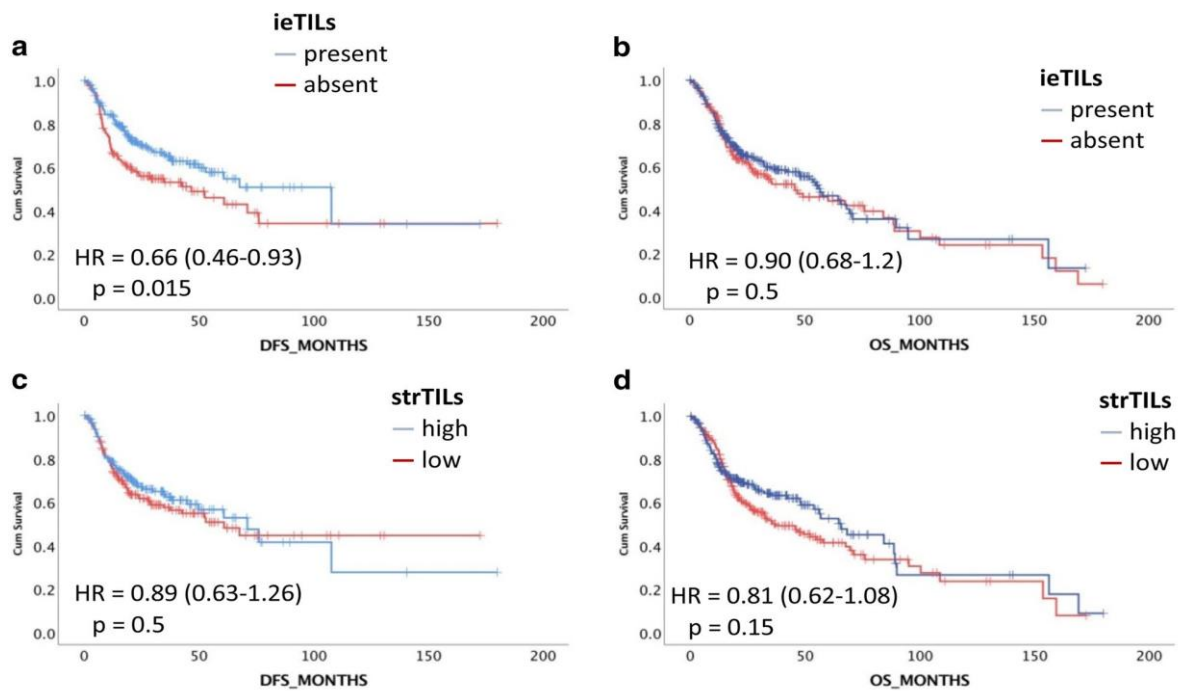
3.3 Multivariate Überlebensanalyse

IeTILs, strTILs, T-Zellen und die PD-L1-Expression wurden unabhängig von klinisch-pathologischen Tumoreigenschaften auf ihre prognostische Auswirkung analysiert. Intraepitheliale TILs, die in der univariaten Analyse von DFS signifikant prognostisch waren, zeigten einen

nicht-signifikanten Trend zu einer besseren Prognose in der multivariaten Analyse von DFS (HR = 0,77; p = 0,15). Stromale TILs, die einen Trend zu einer besseren Prognose bei der univariaten Analyse von OS zeigten, waren bei der multivariaten Analyse von OS signifikant prognostisch (HR = 0,74; p = 0,04). T-Zellen, die in den univariaten Analysen von OS und DFS positiv prognostisch waren, blieben in der multivariaten Analyse von DFS (HR = 0,87; p = 0,08) grenzwertig signifikant und in der multivariaten Analyse von OS (HR = 0,85; p = 0,01) signifikant. Die PD-L1-mRNA-Expression zeigte weder in univariaten noch multivariaten Analyse signifikante Assoziationen mit DFS oder OS.

Um die Beiträge des Vorhandenseins von Immunzellinfiltraten und der PD-L1-Expression zur Prognose zu analysieren, führten wir eine bivariate Analyse von ieTILs, strTILs oder T-Zellen und PD-L1-mRNA-Expression durch. Während die PD-L1-mRNA-Expression in der univariaten Analyse keine signifikante Auswirkung auf die Prognose zeigte, war diese in der gemeinsamen Analyse mit T-Zellen ein negativer Marker für DFS (HR = 1,13; p = 0,03) und OS (HR = 1,12; p = 0,02).

PD-L1 blieb in multivariaten Analysen zusammen mit T-Zellen sowie mit Alter, HPV-Status, Raucherstatus, Tumorstadium, Tumorgrad und Tumorlokalisation signifikant (DFS: HR = 1,17; p = 0,01; OS: HR = 1,14; p = 0,01). In allen bivariaten und multivariaten Analysen zusammen mit der PD-L1-Expression war die Abundanz der T-Zellen ein starker positiver Prognosemarker.



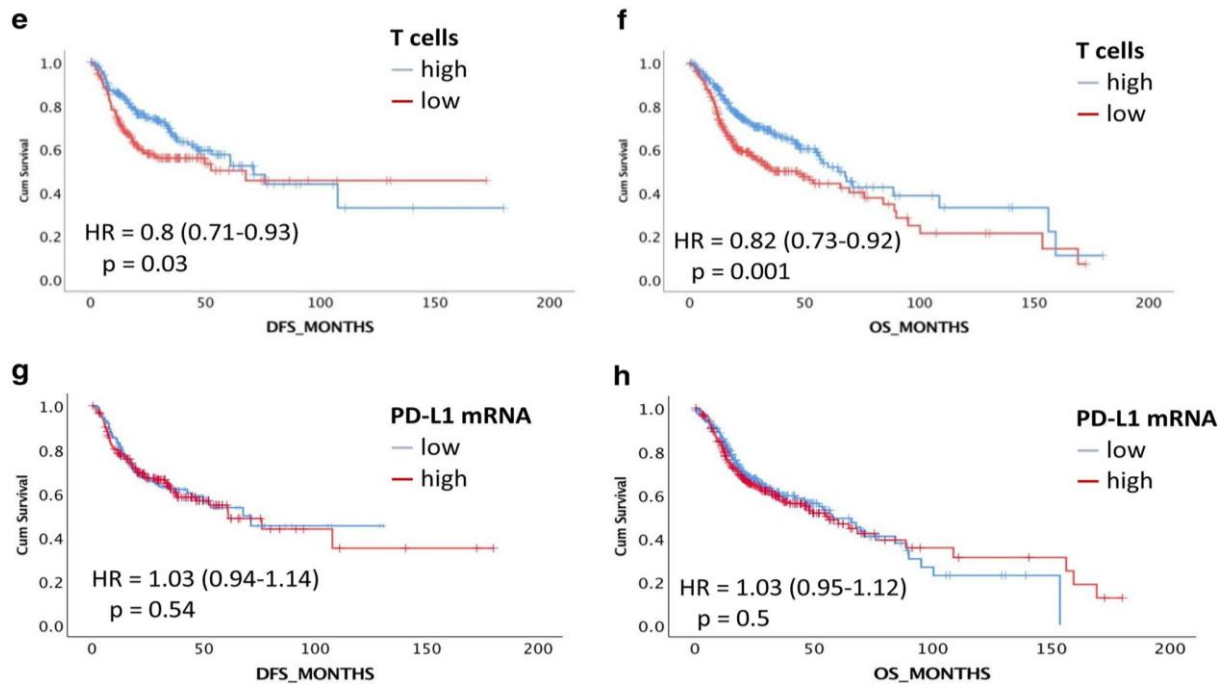


Abbildung 3: Immuzellinfiltrate als positiver prognostischer Marker für HNSCC (TCGA-Kohorte). **a, b** Intraepitheliale TILs waren ein signifikanter positiver Prognosemarker für DFS, jedoch nicht für OS. **c, d** Stromale TILs zeigten einen Trend zu einer besseren Prognose für OS, jedoch nicht für die DFS. **e, f** Die Abundanz von T-Zellen (geschätzt aus mRNA-Expressionsdaten unter Verwendung des MCP-Zählers, Schnittpunkt: Median) war ein signifikanter positiver prognostischer Marker sowohl für DFS als auch für OS. **g, h** Die PD-L1-mRNA-Expression (Schnittpunkt: Median) korrelierte nicht mit DFS und OS.

3.4 Korrelationsanalyse

Schließlich untersuchten wir die Assoziationen zwischen den Immunbiomarkern (Abb. 4). T-Zellen waren in Tumoren mit starker strTIL-Infiltration (Fold Change = 1,4; $p = 1,8e-06$) und in Tumoren mit vorhandenen ieTILs (Fold Change = 1,4; $p = 0,00012$) erhöht. Die PD-L1-Expression war in Tumoren mit starker strTIL-Infiltration (Fold Change = 1,6; $p = 6,8e-05$) erhöht, hing jedoch nicht von der Anwesenheit von ieTILs ab. Die PD-L1-Expression korrelierte signifikant mit dem Ausmaß der T-Zell-Infiltration ($R = 0,44$; $p = 1e-22$). Diese Korrelation war auch in der Untergruppe der HPV+ Tumoren ($R = 0,38$; $p = 0,0014$) sowie in der Untergruppe der HPV- Tumoren ($R = 0,47$; $p = 6,2e-22$) hoch signifikant. Der Grad an T-Zell-Infiltration war in HPV+ höher als in HPV- Tumoren (Fold Change = 1,73; $p = 2,7e-05$), während die PD-L1-mRNA-Expression zwischen HPV+ und HPV- Tumoren nicht signifikant unterschiedlich war.

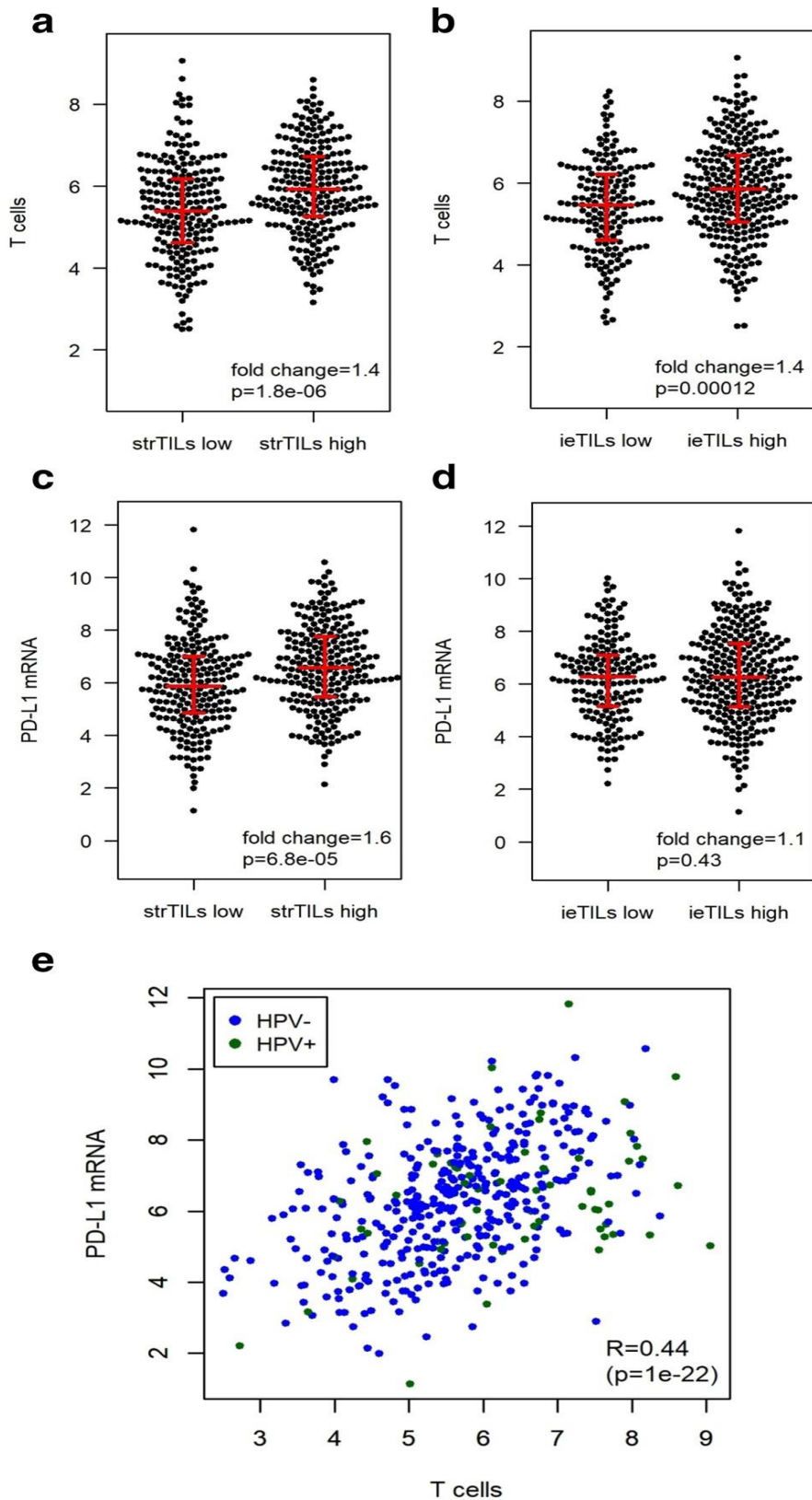


Abbildung 4: Beziehung zwischen TILs, T-Zell-Häufigkeit und PD-L1-mRNA-Expression in HNSCC (TCGA-Kohorte). **a, b** T-Zellen waren erhöht, wenn strTILs hoch waren oder ieTILs vorhanden waren. **c, d** Die PD-L1-Expression war erhöht, wenn die strTILs hoch waren, hing jedoch nicht von der Anwesenheit von ieTILs ab. **e** Assoziation der PD-L1-Expression mit der T-Zell-Häufigkeit. PD-L1 korrelierte positiv mit T-Zellen in HPV- Tumoren ($R = 0,47$), in HPV+ Tumoren ($R = 0,38$) und in allen Tumoren ($R = 0,44$). Beim Vergleich von HPV+ und HPV- Tumoren waren die T-Zell Expression erhöht (Fold Change = 1,73; $p = 2,7E - 05$), während sich die PD-L1-mRNA-Expressionslevels nicht signifikant unterschieden.

4 Diskussion

Wir haben den Zusammenhang zwischen dem klinischen Ergebnis und der Infiltration mit Immunzellen in einer großen Kohorte von klinisch und molekular gut charakterisierten HNSCC untersucht. Unsere Studie ist die erste Studie, die histomorphologische Muster der Immunzellinfiltration (TILs) und mRNA-Expressionsdaten von Immunzellen im HNSCC integriert. Die TILs wurden durch histomorphologische Auswertung digitaler HE-gefärbter Objektträgerbilder analysiert und ihre räumliche Verteilung wurde getrennt für ieTILs und strTILs bewertet. IeTILs und strTILs war bei der Mehrzahl der Tumoren (61%) identisch, bei den restlichen 39% der Fälle jedoch unterschiedlich. Die Häufigkeit von acht Arten von Immunzellen und zwei Arten von Stromazellen im TME wurde aus RNA-Seq-Daten mittels Verwendung der bioinformatischen Methode MCP-Zähler geschätzt [26]. Insbesondere wurde die Häufigkeit von T-Zellen als Mittelwert der Expression von 16 Genen, darunter CD3D, CD3G und CTLA4, geschätzt. Zusätzlich wurde die PD-L1-mRNA-Expression analysiert.

HPV-positive HNSCC weisen ein von HPV-negativen HNSCC verschiedenes Risikoprofil und eine unterschiedliche Pathophysiologie auf. Diese Krankheit ist im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren auch durch eine spezifische biologische und klinische Darstellung gekennzeichnet. Klinisch weisen HPV-positive Tumoren meist ein niedriges T-Stadium auf, jedoch oft mit einem Befall von Lymphknoten (N+). Folglich wird die Mehrzahl dieser Tumoren in einem lokal fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Patienten mit HPV-positivem HNSCC sind tendenziell jünger als Patienten mit HPV-negativen Tumoren mit einem Altersunterschied von 4 bis 10 Jahren. Rauchen und Alkoholmissbrauch sind bei Patienten mit HPV positiven Tumoren weniger häufig als bei Patienten mit HPV negativen Tumoren [27].

HPV positive und HPV negative HNSCC Tumoren gehören zu den am stärksten immuninfiltrierten Tumorarten und weisen den höchsten Grad an Treg-Infiltration auf. Diese Tumoren könnten von einer Immuntherapie profitieren, die auf Treg abzielende Ansätze einschließt [28].

Eine höhere Immunaktivität bei HPV+ Tumoren im Vergleich zu HPV- Tumoren zeigte sich durch eine höhere Anzahl von Tumoren mit ieTILs (77 % vs. 58 %) und eine höhere Abundanz von T-Zellen(69 % vs. 46 %). Im Gegensatz dazu waren strTILs und die PD-L1-mRNA-Expression zwischen HPV+ und HPV- Tumoren nicht signifikant unterschiedlich.

Eine umfassende Metaanalyse des prognostischen Werts der an HE-Schnitten ausgewerteten TILs wurde für HNSCC-Patienten bisher nicht durchgeführt. Metaanalysen für Patienten mit

Lungenkarzinom und Mammakarzinom zeigten jedoch, dass hohe TIL-Zahlen mit einem günstigen Ergebnis bei beiden Krebsarten assoziiert waren [29].

Obwohl HPV-positive HNSCC häufig mit einer Lymphknotenmetastasierung einhergeht, sind Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben für diese Tumoren in der Regel länger als bei HPV-negativen Tumoren. Eine Hypothese ist, dass die Immunantwort gegen virale Antigene die Elimination von Tumorzellen vorantreiben könnte [30][31]. In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde die Anzahl der TILs verwendet, um HPV+ Tumoren in verschiedene Risikogruppen einzuteilen, wobei die dichtesten Immuninfiltrate mit einer signifikant verbesserten Überlebensrate einhergingen. Insbesondere CD8+ und FOXP3+ T-Zellen waren positiv mit dem krankheitsspezifischen Überleben bei Patienten mit HPV+ Oropharynxkarzinom assoziiert [14].

T-Zellen können bei Krebspatienten in zwei Gruppen eingeteilt werden: Tumor-infiltrierende T-Zellen und zirkulierende T-Zellen. Diese beiden Komponenten des T-Zell-Repertoires sind miteinander assoziiert, weisen jedoch unterschiedliche Verteilungen von Subklonen sowie unterschiedliche klinische Bedeutung auf. Es ist gut dokumentiert, dass die Anzahl oder der Anteil der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) mit einer besseren Prognose bei verschiedenen Krebsarten verbunden ist. Krebszellen können jedoch Wege finden, um der Immunantwort zu entgehen, indem sie TILs erschöpfen oder inaktivieren. Es ist daher wichtig, die T-Zell-Subklone zu identifizieren, die Krebszellen effizient abtöten können, und zu versuchen, sie durch verschiedene Strategien zu verbessern [32].

Wir fanden, dass die T-Zell-Infiltration stark mit der Tumorlokalisierung korrelierte ($p < 0,001$). Tumoren in Tonsillen sowie am Zungengrund hatten die höchste T-Zell-Infiltration (83 % und 71 %).

Große epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Mandeln die häufigste Lokalisation für Oropharynxkarzinome sind [33]. Die neue WHO-Klassifikation unterteilt Mandelkarzinome in zwei verschiedene morphologische Gruppen: HPV-positive und HPV-negative. Die Prognose des Mandelkarzinoms hängt vom HPV-Status des Tumors ab. HPV-positive Tumoren wiesen ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 71 % gegenüber 46 % bei HPV-negativen Erkrankungen auf [34].

In der Studienkohorte war die PD-L1-mRNA-Expression bei Nichtrauchern höher (59 %) als bei Rauchern (46 %), während die anderen Immunmarker nicht mit dem Raucherstatus in Zusammenhang standen. Unter Verwendung des von Alexandrov definierten Mutations-Signatur-

Frameworks wurde gefunden, dass der Anteil der Mutationsprozesse in jedem auf Tabak-Rauchen zurückgeführten Tumor umgekehrt mit dem Level an T-Zell-Infiltration, Immunzell-Infiltration und IFN & gamma Signalisierung korrelierte [35]. Die CHECKMATE-141-Studie zu Nivolumab berichtete einen geringeren Überlebensvorteil bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern [36].

Es wurde gezeigt, dass die Expression von PD-L1 auf der Membran von Tumor- und Immunzellen mit erhöhten objektiven Ansprechraten auf den Immun-Checkpoint-Inhibitor zusammenhängt [37].

Die Stärke der Assoziation mit dem Patientenüberleben wurde für die zwei histomorphologischen Immunmarker (ieTILs und strTILs) und für die zwei auf mRNA-Expression basierenden Immunmarker (T-Zellen und PD-L1) verglichen. Für alle vier Marker wurde eine dichotomisierte Graduierung („hoch“ gegen „niedrig“) verwendet, um den Vergleich in Bezug auf HRs und p-Werte zu erleichtern. In univariaten Überlebensanalysen waren ieTILs und T-Zellen signifikante Prognosemarker, während strTILs grenzwertig und die Expression von PD-L1-mRNA nicht signifikant waren. In der Studienkohorte war das Vorhandensein von ieTILs ein positiver Prognosefaktor für das DFS (HR = 0,66; p = 0,015) und in der HPV-negativen Unterkohorte (HR = 0,68; p = 0,04), jedoch nicht in der HPV-positiven Kohorte. Umgekehrt war die Abundanz von T-Zellen in der Studienkohorte (HR = 0,80; p = 0,03) und in der HPV-positiven Unterkohorte (HR = 0,20; p = 0,001) ein positiver Prognosefaktor für die DFS. Diese Faktoren zeigten in der HPV-negativen Unterkohorte hingegen keine prognostische Signifikanz.

Bereits Ende der 1980er Jahre wurden bei oralen Krebspatienten signifikante Unterschiede in der Effektor-Funktion zwischen TILs und Lymphozyten aus dem peripheren Blut festgestellt [28]. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen zeigte eine kürzlich durchgeführte Studie, dass TILs von HNSCC einen signifikant unterdrückten Tc1/TH1-Phänotyp im Vergleich zu CD8+ T-Zellen aus dem peripheren Blut passender Patienten aufwiesen. In Übereinstimmung mit diesen Befunden waren die für die Checkpoint-Rezeptoren wie CTLA-4, TIM-3 und PD-1 positiven Subpopulationen in den Tregs innerhalb der Tumormikroumgebung im Vergleich zu den Tregs im zirkulierenden Blut häufiger signifikant. Tregs aus den TILs zeigten auch eine stärkere hemmende Wirkung als solche aus dem peripheren Blut [38]. In unserer Studie wurden zusätzlich zu tumorinfiltrierenden Lymphozyten und stromalen Lymphozyten auch Lymphozyten an der Invasionsfront ausgewertet. Diese Variable wurde später aus der Analyse herausgenommen, da nur eine Minderzahl (254 von 518 Fälle) von Gewebeschnitten der TCGA-Kohorte Bereiche mit dem Tumorrand und angrenzenden Normalgewebe aufwies. Es ergab

sich für die auswertbaren Fälle keine signifikante Korrelation mit der Prognose. Da die Mehrzahl der analysierten Gewebeschnitte keine oder nur kleine Normalgewebereiche aufwies, ist davon auszugehen, dass die gesamten oder der Großteil der zur Schätzung der Höhe der T-Zellen-Infiltrate verwendeten Genexpression von TILs (und nicht von gewebeständigen Lymphozyten) stammt. Eine Unterscheidung verschiedener Lymphozytenarten ist nur durch immunhistologische Färbungen sicher möglich und daher außerhalb der Reichweite der derzeitigen Studie an HE-Geweben. Die Frage nach einer verschiedenen Qualität von TILs und gewebeständigen Lymphozyteninfiltraten kann daher durch die Studie nicht beantwortet werden.

In unsere Studie war die Korrelation zwischen ieTILs und strTILs positiv und signifikant ($p < 0,001$). Die Bewertung von ieTILs und strTILs stimmte in 274 Fällen (60,8 %) überein. Darüber hinaus haben wir in unsere Analyse festgestellt, dass Patienten mit Tumoren mit hohen Anzahlen an T-Zellen ein signifikant besseres DFS sowie ein signifikant besseres OS hatten als Patienten mit Tumoren mit geringen Zahlen von T-Zellen. Tumoren mit nachweisbaren ieTILs hatten ein besseres DFS im Vergleich zu Tumoren ohne ieTILs, aber die Auswirkung auf das OS war nicht signifikant. Hingegen war das Vorhandensein von strTILs grenzwertig mit einem besseren OS assoziiert, jedoch nicht mit dem DFS. Dies kann mit der unterschiedlichen Biologie der primären, rezidivierenden und metastasierten Erkrankung sowie mit unterschiedlichen Therapiestrategien in der adjuvanten und metastasierten Situation zusammenhängen.

Eine kürzlich durchgeführte Studie untersuchte formalinfixiertes in Paraffin eingebettetes (FFPE) HNSCC Gewebe von 161 Patienten mit einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 48 Monaten. Eine hohe CD3- oder CD8-Expression auf TILs wurde als unabhängiger Faktor für ein günstiges Gesamtüberleben, ein lokales progressionsfreies Überleben und ein Überleben ohne Fernmetastasen identifiziert. Unerwarteterweise war in einer kleinen Kohorte von Patienten ($n = 52$) mit Karzinomen der Mundhöhle die Anzahl der CD4- oder CD8-T-Zellen nicht mit dem Gesamtüberleben assoziiert [39]. Im Gegensatz dazu ergab eine kürzlich durchgeführte größere retrospektive Studie mit 278 Patienten, dass erhöhte CD4 und CD8 TIL-Expression signifikante unabhängige prognostische Variablen waren [40]. Erhöhte CD4- und CD8-Expression war mit günstigem Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben assoziiert.

Es gibt verschiedene Bewertungsmethoden für die Beurteilung tumorinfiltrierender Lymphozyten (TILs). Die Bewertungsmethoden umfassen die Clark-Bewertung [41][42], das Bewertungssystem des Melanoma Institute Australia [43], ein Bewertungssystem, das in der Studie von Saldanha et al. verwendet wurde [44], das Bewertungssystem, das in der TCGA-Studie

verwendet und von Park et al. modifiziert wurde [45] und das kürzlich von der "International Immuno-Oncology Biomarker Working Group" vorgeschlagene System für die Bewertung von TILs bei allen soliden Tumoren [46]. Im Vergleich zu unserem Bewertungssystem finden wir folgendes: Erstens kombiniert unser System Vorteile der drei bereits publizierten Systeme und ermöglichte eine datengetriebene Festlegung der Schwellenwerte für die Klassifikationen "ieTILs present vs. Absent" und "strTILs high vs. Low". Zweitens ist unsere Methode unseres Wissens die erste, bei der ieTILs und strTILs im HNSCC getrennt quantifiziert werden. Die getrennte Auswertung erwies sich im Nachhinein als sinnvoll und sollte im HNSCC in Zukunft so durchgeführt werden, da sich in einer großen Zahl von Fällen (39,2 %) eine abweichende Bewertung ergab.

Die Analyse des Transkriptoms wurde im TCGA-Projekt mittels RNA-Seq durchgeführt. Dabei gingen nicht nur die Tumorzellen, sondern das gesamte Tumormikromilieu inklusive Stromazellen und Immunzellen in die Analyse ein. Die entsprechenden Genexpressiondaten können daher genutzt werden, um auf die Zusammensetzung des Tumormikromilieus zurückzuschließen.

In den letzten Jahren sind verschiedene Methoden entwickelt worden, die es erlauben aus Genexpressionsdaten die Abundanz von Immunzellen im Tumormikromilieu zu schätzen, zum Beispiel CIBERSORT und MCP-Counter. Die MCP-Counter-Methode ist mathematisch einfacher und möglicherweise robuster (MCP-Counter basiert auf der Expression von Markergenen, während CIBERSORT maschinelles Lernen und Genexpressionssignaturen verwendet).

Wir hatten die Möglichkeit, die gesamte TCGA-Kohorte (n = 510 Fälle mit verfügbaren RNA-Seq-Daten) zu analysieren. Die größere Stichprobengröße ermöglichte Schichtanalysen nach HPV-Status, bei denen die T-Zell-Expression in der HPV-positiven Unterkohorte eine besonders hohe Vorhersagekraft zeigte, während keine signifikante Assoziation der T-Zell-Expression mit dem Überleben in der HPV-negativen Unterkohorte bestand. In der univariaten Überlebensanalyse war die PD-L1-mRNA-Expression (als dichotomisierte Variable und als kontinuierliche Variable) weder für die DFS noch für das OS in der Studienkohorte prädiktiv. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung empfahl eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse, die PD-L1-Proteinexpression nicht für die Überlebensvorhersage bei HNSCC-Patienten wegen unschlüssiger und inkonsistenter Ergebnisse in der Literatur zu verwenden [47]. In der Dynamik der Tumorprogression ist die Expression des Immun-Checkpoint-Regulators PD-L1 auf Tumorzellen ein ungünstiger Schritt im Zusammenhang mit der Immunevasion [48]. In der Studienkohorte waren die PD-L1-mRNA und T-Zell-Level signifikant positiv korreliert

($R = 0,44$). In bivariaten Modellen, die beide Variablen umfassten, war die PD-L1-mRNA-Expression ein negativer prognostischer Marker für DFS und OS, während die T-Zell Abundanz ein positiver prognostischer Marker blieb. Darüber hinaus blieben beide molekularen Variablen prognostische Marker für DFS und OS in multivariaten Modellen mit beiden Markern und zusätzlichen klinisch-pathologischen Parametern (Alter, HPV-Status, Raucherstatus, Tumorstadium, Tumorgrad und Tumorlokalisation). In der Metaanalyse von Gu et al. war die PD-L1-Expression ein negativer Prognosefaktor bei Patienten mit geringer Infiltration mit CD8+-T-Zellen [47]. In Übereinstimmung damit sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass im HNSCC die prognostische Relevanz der PD-L1-Expression zusammen mit dem gesamten immunologischen Tumorstatus einschließlich des Grades der T-Zell-Infiltration bewertet werden sollte.

In der Studienkohorte waren T-Zellen und in etwas geringerem Maße CD8+-T-Zellen mit günstigem DFS und OS assoziiert.

In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde festgestellt, dass die Infiltration von CD4+-, CD8+- und FOXP3+-T-Zellen mit dem verlängerten Überleben bei Patienten, die eine Chemoradiationstherapie erhielten, korrelierte [49]. Interessanterweise wurde bei Patienten, die operiert wurden, nur eine leichte Verbesserung des Gesamtüberlebens bei Patienten mit hohen Zahlen an CD8-Zellen festgestellt [50]. Zuvor wurde auch festgestellt, dass T-Zellen im peripheren Blut ebenfalls prognostischen Wert haben. In einem Review verschiedener Studien und Metaanalysen, die sich auf die prognostischen Werte von T-Zellen konzentrieren, scheint das Vorhandensein von zytotoxischen CD8-T-Zellen in verschiedenen Tumorarten (Brustkrebs 25 Metaanalysen mit über 22000 Patienten, Darmkrebs Metaanalyse von 9 Studien, Ovarialkarzinom 10 Studien mit 1815 Patienten, Nicht-kleinzelligem Lungenkrebs Metaanalyse mit über 86000 Patienten, Melanom, HNSCC, Urothelkrebs, Hepatozelluläres Karzinom 2 Metaanalysen) mit einem verbesserten Überleben verbunden zu sein [51].

Aktuelle klinische Studien mit Immun-Checkpoint-Hemmern bei HNSCC haben vielversprechende Ergebnisse gezeigt. In der Studie KEYNOTE-012 (NCT01848834) mit 192 Patienten mit rezidivierendem/metastasierendem HNSCC, die mit dem Anti-PD-1-Wirkstoff Pembrolizumab behandelt wurden, wurde eine Gesamtansprechrates von 17,7 % beobachtet. In dieser Kohorte betrug die ORR bei HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren 21,9 % bzw. 15,9 %. Zuletzt zeigte die randomisierte klinische Phase-III-Studie CheckMate-141 (NCT02105636) bei Patienten mit rezidivierendem oder metastasierendem, platinresistentem HNSCC, die mit

dem Anti-PD-1-Wirkstoff Nivolumab behandelt wurden, eine Verbesserung des OS im Vergleich zu denjenigen, die mit Cetuximab, Methotrexat oder Docetaxel behandelt wurden. Das OS bei HPV-positiven Patienten, die mit Nivolumab behandelt wurden, betrug 9,1 Monate gegenüber 4,4 Monaten im Kontrollarm, während das OS bei HPV-negativen Patienten 7,5 Monate gegenüber 5,8 Monaten betrug. Konsistent mit den Beobachtungen an der Studien-Kohorte könnten die verbesserten Ansprechraten bei HPV-positiven Tumoren teilweise mit ihrer höheren Immuninfiltration zusammenhängen.

Diese Ergebnisse haben die FDA dazu veranlasst, Nivolumab als bahnbrechende Therapie für Patienten mit rezidivierendem oder metastasierendem HNSCC zu bezeichnen und zuzulassen. Diese Studien deuten darauf hin, dass ein erheblicher Teil der Patienten mit HNSCC der Immun-Checkpoint-Hemmern von dauerhaftem klinischem Nutzen ist. Dennoch ist der Großteil der Tumoren weiterhin therapieresistent. Tatsächlich betrug die ORR bei mit Nivolumab behandelten HNSCC-Patienten 13,3 %, wobei das progressionsfreie 1-Jahres-Überleben weniger als 10 % betrug [23]. In unserer Studie hatten Tumoren mit ieTILs ein besserer DFS im Vergleich zu Tumoren ohne ieTILs. Intraepitheliale TILs blieben ein positiver Prognosefaktor für DFS in der HPV-negativen Untergruppe, jedoch nicht in der HPV-positiven Untergruppe. Stromale TILs zeigten keine prognostischen Auswirkungen bei HPV-positiven oder HPV-negativen Tumoren. Hohe T-Zellwerte waren bei HPV-positiven Tumoren positiv mit DFS und OS assoziiert und zeigten einen Trend zu besserem OS bei HPV-negativen Tumoren. In der multivariaten Analyse der ieTILs, strTILs, T-Zellen und der PD-L1-Expression fanden wir, dass ieTILs einen nicht signifikanten Trend zu einer besseren Prognose in der multivariaten Analyse des DFS zeigten. Stromale TILs waren dagegen in der multivariaten Analyse des OS signifikant prognostisch. Interessanterweise war bei der bivariaten Analyse von T-Zellen und PD-L1-mRNA-Expression die PD-L1-mRNA für DFS und OS ein negativer Marker, während bei der univariaten Analyse die PD-L1-mRNA-Expression keinen signifikanten prognostischen Wert aufwies.

Kolorektale Tumore wurden weltweit anhand des TIL-Profiles klassifiziert. Die Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) hat ein Immunoscore-Validation-Project gestartet, um die prognostische Bedeutung des T-Zell-basierten Immunoscore bei mehr als 5.000 Darmkrebspatienten zu überprüfen [52].

Die Entwicklung eines erweiterten Panels mit TIL und Krebszellenfaktoren, die dem immunogenen Potenzial des Panels zugrunde liegen, wäre daher von entscheidender Bedeutung, um das Potenzial einer präzisen Immuntherapie auszuschöpfen.

Es gibt zwei Voraussetzungen für eine erfolgreiche Reaktion eines Tumors auf eine Immun-Checkpoint-Blockade. Die erste Voraussetzung ist die Infiltration von Immunzellen und die Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem. Immunzellen müssen zunächst den vom Tumor selbst ausgeübten interstitiellen Druck überwinden, um eine erfolgreiche Infiltration zu erreichen. Glücklicherweise treten Kopf-Hals-Tumore an Stellen mit hoher Lymphgefäßdichte (wie dem Oropharynx und den zervikalen Lymphknoten) auf und haben somit die Möglichkeit, mit dem Immunsystem in Kontakt zu treten. Dies steht im Einklang mit unserer Feststellung, dass HNSCC zu den am stärksten immuninfiltrierten Krebsarten gehört. Dies allein kann jedoch keine erfolgreiche Interaktion zwischen dem Immunsystem (insbesondere dem adaptiven Immunsystem) und dem Tumor sicherstellen. Dies erfordert die Erkennung geeigneter Antigene durch die Effektoren der adaptiven Immunität (z. B. CTLs).

Die zweite Voraussetzung einer erfolgreichen anhaltenden Antitumor-Immunantwort ist die Freiheit von immunhemmenden Einflüssen durch den Tumor selbst und immunsuppressiven Zellen. Einzeln oder zusammen ermöglichen diese Einflüsse eine Immunevasion. Die T-Zell-Erschöpfung erfolgt über T-Zell-spezifische intrinsische Mechanismen wie den PD-1/PD-L1-Weg sowie andere immunregulatorische Rezeptoren, darunter CTLA-4, TIM-3, LAG-3 [53].

Es ist noch nicht geklärt, ob eine Bewertung der Immunzelleninfiltrate basierend auf HE-gefärbten Gewebeschnitten ausreichende Informationen für die klinische Entscheidungsfindung im Rahmen einer Immuntherapie für HNSCC liefert. Ein Vorteil dieser Methodik liegt darin, dass hierfür kein neues Gewebematerial benötigt wird und keine molekularbiologischen Untersuchungen notwendig sind. Ein Nachteil besteht darin, dass aus der Beurteilung eines HE-Schnitts keine Informationen bezüglich spezifischer Immunzellenarten und ihres Funktionsstatus erhalten werden können. Ob an dieser Stelle immunhistologische Färbungen oder mRNA-Expressionsprofile einen Vorteil bringen, müssen weitere Studien noch zeigen.

HNSCC ist eine Krebsart mit hoher Immunzelleninfiltration ähnlich wie Melanome, Nierenzellkarzinome und NSCLC. HNSCC ist ein ausgezeichneter Kandidat für die Untersuchung immuntherapeutischer Ansätze mit ersten bereits zugelassenen Immun-Checkpoint-Hemmern. Aus diesem Grund empfehlen wir weitere Untersuchungen der PD-L1-mRNA-Expression, T-Zell-Infiltration, ieTILs und strTILs als mögliche prädiktive Biomarker für die Immuntherapie.

Quellenverzeichnis

1. Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
2. Farkona, Sofia, Eleftherios P. Diamandis, and Ivan M. Blasutig. 2016. "Cancer Immunotherapy: The Beginning of the End of Cancer?" *BMC Med* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0623-5>.
3. Jiang, Xianjie, Jie Wang, Xiangying Deng, Fang Xiong, Junshang Ge, Bo Xiang, Xu Wu, Jian Ma, Ming Zhou, and Xiaoling Li. 2019. "Role of the Tumor Microenvironment in PD-L1/PD-1-Mediated Tumor Immune Escape." *Mol Cancer* 18 (1). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0928-4>.
4. Kuss, I. 2004. "Decreased Absolute Counts of T Lymphocyte Subsets and Their Relation to Disease in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck." *Clinical Cancer Research* 10 (11): 3755–62. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-0054>.
5. Bauernhofer, Thomas, Iris Kuss, Brent Henderson, Andrew S. Baum, and Theresa L. Whiteside. 2003. "Preferential Apoptosis of CD56dim Natural Killer Cell Subset in Patients with Cancer." *Eur. J. Immunol.* 33 (1): 119–24. <https://doi.org/10.1002/immu.200390014>.
6. Dasgupta, Santanu, Malaya Bhattacharya-Chatterjee, Bert W. O'Malley, and Sunil K. Chatterjee. 2005. "Inhibition of NK Cell Activity through TGF- β 1 by Down-Regulation of NKG2D in a Murine Model of Head and Neck Cancer." *J Immunol* 175 (8): 5541–50. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5541>.
7. López-Albaitero, Andrés, Jayakar V. Nayak, Takeshi Ogino, Avinash Machandia, William Gooding, Albert B. DeLeo, Soldano Ferrone, and Robert L. Ferris. 2006. "Role of Antigen-Processing Machinery in the In Vitro Resistance of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Cells to Recognition by CTL." *J Immunol* 176 (6): 3402–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3402>.
8. Ferris, R. L. 2006. "Immune Escape Associated with Functional Defects in Antigen-Processing Machinery in Head and Neck Cancer." *Clinical Cancer Research* 12 (13): 3890–95. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-05-2750>.
9. Tjin, Esther P M, and Rosalie M Luiten. 2014. "Tumor-Infiltrating T-Cells: Important Players in Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients." *OncoImmunology* 3 (9): e954862. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.954862>.
10. Chaudhary, Belal, and Eyad Elkord. 2016. "Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting." *Vaccines* 4 (3): 28. <https://doi.org/10.3390/vaccines4030028>.
11. Hadrup, Sine, Marco Donia, and Per thor Straten. 2013. "Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment." *Cancer Microenvironment* 6 (2): 123–33. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0127-6>.

12. De Meulenaere, Astrid, Tjil Vermassen, Sandrine Aspeslagh, Katrien Vandecasteele, Sylvie Rottey, and Liesbeth Ferdinande. 2017. "TILs in Head and Neck Cancer: Ready for Clinical Implementation and Why (Not)?" *Head and Neck Pathol* 11 (3): 354–63. <https://doi.org/10.1007/s12105-016-0776-8>.
13. Emens, Leisha A. 2012. "Breast Cancer Immunobiology Driving Immunotherapy: Vaccines and Immune Checkpoint Blockade." *Expert Review of Anticancer Therapy* 12 (12): 1597–1611. <https://doi.org/10.1586/era.12.147>.
14. Zgură, Anca, Laurenția Galeș, Mihai Mitran, Elvira Brătilă, and Rodica ANGHEL. 2018. "Relationship between Tumor Infiltrating Lymphocytes and Progression in Triple Negative Breast Cancer." *Ginecologia.Ro* 21 (3) (1): 28–30. <https://doi.org/10.26416/gine.21.3.2018.1948>.
15. Lei, Yu, Yuying Xie, Yee Sun Tan, Mark E. Prince, Jeffrey S. Moyer, Jacques Nör, and Gregory T. Wolf. 2016. "Telltale Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Oral, Head & Neck Cancer." *Oral Oncology* 61: 159–65. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.08.003>.
16. Abu Eid, Rasha. 2019. "Editorial: Advances in Head and Neck Cancer Immunology and Immunotherapy." *Front. Oncol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00172>.
17. Wang, Chuan, James Dickie, Ruhcha V. Sutavani, Catherine Pointer, Gareth J. Thomas, and Natalia Savelyeva. 2018. "Targeting Head and Neck Cancer by Vaccination." *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00830>.
18. Riley, Rachel S., Carl H. June, Robert Langer, and Michael J. Mitchell. 2019. "Delivery Technologies for Cancer Immunotherapy." *Nat Rev Drug Discov* 18 (3): 175–96. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>.
19. Lazzari, Chiara, Niki Karachaliou, Alessandra Bulotta, Mariagrazia Viganó, Aurora Mirabile, Elena Brioschi, Mariacarmela Santarpia, Luca Gianni, Rafael Rosell, and Vanesa Gregorc. 2018. "Combination of Immunotherapy with Chemotherapy and Radiotherapy in Lung Cancer: Is This the Beginning of the End for Cancer?" *Ther Adv Med Oncol* 10: 175883591876209. <https://doi.org/10.1177/1758835918762094>.
20. Yan, Yiyi, Anagha Bangalore Kumar, Heidi Finnes, Svetomir N. Markovic, Sean Park, Roxana S. Dronca, and Haidong Dong. 2018. "Combining Immune Checkpoint Inhibitors With Conventional Cancer Therapy." *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01739>.
21. "Immunological Agents Used in Cancer Treatment." 2019. *Eurasian J Med* 51 (1): 90–94. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.18194>.
22. Topalian, Suzanne L., F. Stephen Hodi, Julie R. Brahmer, Scott N. Gettinger, David C. Smith, David F. McDermott, John D. Powderly, Richard D. Carvajal, Jeffrey A. Sosman, and Michael B. Atkins. 2012. "Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer." *N Engl J Med* 366 (26): 2443–54. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1200690>.

23. Cohen, Ezra E. W., R. Bryan Bell, Carlo B. Bifulco, Barbara Burtness, Maura L. Gillison, Kevin J. Harrington, Quynh-Thu Le, Nancy Y. Lee, Rom Leidner, and Rebecca L. Lewis. 2019. "The Society for Immunotherapy of Cancer Consensus Statement on Immunotherapy for the Treatment of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (HNSCC)." *J. Immunotherapy Cancer* 7 (1). <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0662-5>.
24. Bauml, Joshua M., Charu Aggarwal, and Roger B. Cohen. 2019. "Immunotherapy for Head and Neck Cancer: Where Are We Now and Where Are We Going?" *Ann. Transl. Med* 7 (S3): S75–S75. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.03.58>.
25. Arora, Sanjeevani, Rodion Velichinskii, Randy W. Lesh, Usman Ali, Michal Kubiak, Pranshu Bansal, Hossein Borghaei, Martin J. Edelman, and Yanis Boumber. 2019. "Existing and Emerging Biomarkers for Immune Checkpoint Immunotherapy in Solid Tumors." *Adv Ther* 36 (10): 2638–78. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-01051-z>.
26. Becht, Etienne, Nicolas A. Giraldo, Laetitia Lacroix, Bénédicte Buttard, Nabila Elarouci, Florent Petitprez, Janick Selves, Pierre Laurent-Puig, Catherine Sautès-Fridman, and Wolf H. Fridman. 2016. "Estimating the Population Abundance of Tissue-Infiltrating Immune and Stromal Cell Populations Using Gene Expression." *Genome Biol* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1113-y>.
27. Nevens D, Nuyts S (2015) HPV-positive head and neck tumours, a distinct clinical entity. *B-ENT* 11:81–87
28. Mandal, Rajarsi, Yasin Şenbabaoğlu, Alexis Desrichard, Jonathan J. Havel, Martin G. Dalin, Nadeem Riaz, Ken-Wing Lee, Ian Ganly, A. Ari Hakimi, and Timothy A. Chan. 2016. "The Head and Neck Cancer Immune Landscape and Its Immunotherapeutic Implications" 1 (17). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89829>.
29. Shona Hendry, Roberto Salgado, Thomas Gevaert, Prudence A Russell, Tom John, Bibhusal Thapa, Michael Christie, Koen van de Vijver, M V Estrada, Paula I Gonzalez-Ericsson, Melinda Sanders, Benjamin Solomon, Cinzia Solinas, Gert G G M Van den Eynden, Yves Allory, Matthias Preusser, Johannes Hainfellner, Giancarlo Pruneri, Andrea Vingiani, Sandra Demaria, Fraser Symmans, Paolo Nuciforo, Laura Comerma, E A Thompson, Sunil Lakhani, Seong-Rim Kim, Stuart Schnitt, Cecile Colpaert, Christos Sotiriou, Stefan J Scherer, Michail Ignatiadis, Sunil Badve, Robert H Pierce, Giuseppe Viale, Nicolas Sirtaine, Frederique Penault-Llorca, Tomohagu Sugie, Susan Fineberg, Soonmyung Paik, Ashok Srinivasan, Andrea Richardson, Yihong Wang, Ewa Chmielik, Jane Brock, Douglas B Johnson, Justin Balko, Stephan Wienert, Veerle Bossuyt, Stefan Michiels, Nils Ternes, Nicole Burchardi, Stephen J Luen, Peter Savas, Frederick Klauschen, Peter H Watson, Brad H Nelson, Carmen Criscitiello, Sandra O'Toole, Denis Larsimont, Roland de Wind, Giuseppe Curigliano, Fabrice André, Magali Lacroix-Triki, Mark van de Vijver, Federico Rojo, Giuseppe Floris, Shahinaz Bedri, Joseph Sparano, David Rimm, Torsten Nielsen, Zuzana Kos, Stephen Hewitt, Baljit Singh, Gelareh Farshid, Sibylle Loibl, Kimberly H Allison, Nadine Tung, Sylvia Adams, Karen Willard-Gallo, Hugo M Horlings, Leena Gandhi, Andre Moreira, Fred Hirsch, Maria V Dieci, Maria Urbanowicz, Iva Brcic, Konstanty Korski, Fabien Gaire, Hartmut Koepfen, Amy Lo, Jennifer Giltane, Marlon C Rebelatto, Keith E Steele, Jiping Zha,

- Kenneth Emancipator, Jonathan W Juco, Carsten Denkert, Jorge Reis-Filho, Sherene Loi, Stephen B Fox. 2017. “Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinom.” *Advances in Anatomic Pathology* 24 (6): 311–35. <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000161>.
30. Wittekindt, Claus, Steffen Wagner, Shachi Sharma, Nora Würdemann, Jennifer Knuth, Henrike Reder, and Jens Klußmann. 2018. “HPV – Das Andere Kopf-Hals-Karzinom.” *Laryngo-Rhino-Otol* 97 (S 01): S48–113. <https://doi.org/10.1055/s-0043-121596>.
 31. Kobayashi, Kazuhiro, Kenji Hisamatsu, Natsuko Suzui, Akira Hara, Hiroyuki Tomita, and Tatsuhiko Miyazaki. 2018. “A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer.” *JCM* 7 (9): 241. <https://doi.org/10.3390/jcm7090241>.
 32. Bai, Xueli, Qi Zhang, Song Wu, Xiaoyu Zhang, Mingbang Wang, Fusheng He, Tao Wei, Jiaqi Yang, Yu Lou, and Zhiming Cai. 2015. “Characteristics of Tumor Infiltrating Lymphocyte and Circulating Lymphocyte Repertoires in Pancreatic Cancer by the Sequencing of T Cell Receptors.” *Sci Rep* 5 (1). <https://doi.org/10.1038/srep13664>.
 33. Weatherspoon, Darien J., Amit Chattopadhyay, Shahdokht Boroumand, and Isabel Garcia. 2015. “Oral Cavity and Oropharyngeal Cancer Incidence Trends and Disparities in the United States: 2000–2010.” *Cancer Epidemiology* 39 (4): 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.04.007>.
 34. Westra, William H., and James S. Lewis. 2017. “Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx.” *Head and Neck Pathol* 11 (1): 41–47. <https://doi.org/10.1007/s12105-017-0793-2>.
 35. Van Hoeck, Arne, Niels H. Tjoonk, Ruben van Boxtel, and Edwin Cuppen. 2019. “Portrait of a Cancer: Mutational Signature Analyses for Cancer Diagnostics.” *BMC Cancer* 19 (1). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5677-2>.
 36. Oliva, M., A. Spreafico, M. Taberna, L. Alemany, B. Coburn, R. Mesia, and L.L. Siu. 2019. “Immune Biomarkers of Response to Immune-Checkpoint Inhibitors in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.” *Annals of Oncology* 30 (1): 57–67. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy507>.
 37. Shen, Xiangfeng, Lihong Zhang, Jicheng Li, Yulin Li, Yishu Wang, and Zhi-Xiang Xu. 2019. “Recent Findings in the Regulation of Programmed Death Ligand 1 Expression.” *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01337>.
 38. Li, Jing, and Robert L Ferris. 2014. “PD-1/SHP-2 Negatively Regulate Tc1/Th1 Phenotypic Responses and Activation of T Cells in the Tumor Microenvironment.” *J. Immunotherapy Cancer* 2 (S3). <https://doi.org/10.1186/2051-1426-2-s3-p221>.
 39. Wolf, Gregory T., Douglas B. Chepeha, Emily Bellile, Ariane Nguyen, Daffyd Thomas, and Jonathan McHugh. 2015. “Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) and Prognosis in Oral Cavity Squamous Carcinoma: A Preliminary Study.” *Oral Oncology* 51 (1): 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.09.006>.

40. Liu, Jiuyang, Guifang Yang, Fangfang Chen, and Chunwei Peng. 2019. "Evaluating the Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumor: Practice of a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group." *CMAR* Volume 11: 6815–27. <https://doi.org/10.2147/cmar.s201538>.
41. Clark WHJ, From L, Bernardino EA, Mihm MC. 1969. "The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin". *Cancer Res* 29:705–727
42. Clark, W. H., D. E. Elder, D. Guerry, L. E. Braitman, B. J. Trock, D. Schultz, M. Synnestvedt, and A. C. Halpern. 1989. "Model Predicting Survival in Stage I Melanoma Based on Tumor Progression." *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 81 (24): 1893–1904. <https://doi.org/10.1093/jnci/81.24.1893>.
43. Azimi, Farhad, Richard A. Scolyer, Pavlina Rumcheva, Marc Moncrieff, Rajmohan Murali, Stanley W. McCarthy, Robyn P. Saw, and John F. Thompson. 2012. "Tumor-Infiltrating Lymphocyte Grade Is an Independent Predictor of Sentinel Lymph Node Status and Survival in Patients With Cutaneous Melanoma." *JCO* 30 (21): 2678–83. <https://doi.org/10.1200/jco.2011.37.8539>.
44. Saldanha, Gerald, Katarina Flatman, Kah Wee Teo, and Mark Bamford. 2017. "A Novel Numerical Scoring System for Melanoma Tumor-Infiltrating Lymphocytes Has Better Prognostic Value Than Standard Scoring." *The American Journal of Surgical Pathology* 41 (7): 906–14. <https://doi.org/10.1097/pas.0000000000000848>.
45. Park, Cheol Keun, and Sang Kyum Kim. 2017. "Clinicopathological Significance of Intratumoral and Peritumoral Lymphocytes and Lymphocyte Score Based on the Histologic Subtypes of Cutaneous Melanoma." *Oncotarget* 8 (9). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14736>.
46. Salgado, R., C. Denkert, S. Demaria, N. Sirtaine, F. Klauschen, G. Pruneri, S. Wienert, G. Van den Eynden, F.L. Baehner, and F. Penault-Llorca. 2015. "The Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014." *Annals of Oncology* 26 (2): 259–71. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>.
47. Gu, Xiaobin, Meilian Dong, Zheyang Liu, Yin Mi, Jing Yang, Zhigang Zhang, Ke Liu, Li Jiang, Yue Zhang, and Shiliang Dong. 2019. "Elevated PD-L1 Expression Predicts Poor Survival Outcomes in Patients with Cervical Cancer." *Cancer Cell Int* 19 (1). <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0861-7>.
48. Noh, Hyangsoon, Jiemiao Hu, Xiaohong Wang, Xueqing Xia, Arun Satelli, and Shulin Li. 2015. "Immune Checkpoint Regulator PD-L1 Expression on Tumor Cells by Contacting CD11b Positive Bone Marrow Derived Stromal Cells." *Cell Communication and Signaling* 13 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0093-y>.
49. Santegoets, S. J., C. L. Duurland, E. S. Jordanova, J. J. van Ham, I. Ehsan, S. L. van Egmond, M. J. P. Welters, and S. H. van der Burg. 2019. "Tbet-Positive Regulatory T Cells Accumulate in Oropharyngeal Cancers with Ongoing Tumor-Specific Type 1 T Cell Responses." *J. Immunotherapy Cancer* 7 (1). <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0497-0>.

50. Nguyen, Nghia, Emily Bellile, Daffyd Thomas, Jonathan McHugh, Laura Rozek, Shama Virani, Lisa Peterson, Thomas E. Carey, Heather Walline, and Jeffery Moyer. 2016. "Tumor Infiltrating Lymphocytes and Survival in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." *Head Neck* 38 (7): 1074–84. <https://doi.org/10.1002/hed.24406>.
51. Barnes, Tristan A, and Eitan Amir. 2018. "HYPER or HOPE: The Prognostic Value of Infiltrating Immune Cells in Cancer." *Br J Cancer* 118 (2): e5–e5. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.417>.
52. Sun, Guorui, Xiaoyuan Dong, Xiaolong Tang, Hui Qu, Hao Zhang, and Ensheng Zhao. 2019. "The Prognostic Value of Immunoscore in Patients with Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Cancer Med* 8 (1): 182–89. <https://doi.org/10.1002/cam4.1921>.
53. Kämpers, Christiane, Mladen Jokic, Ozan Haase, Anne Offermann, Wenzel Vogel, Victoria Grätz, Ewan A. Langan, Sven Perner, and Patrick Terheyden. 2019. "Immune Cell Infiltration of the Primary Tumor, Not PD-L1 Status, Is Associated With Improved Response to Checkpoint Inhibition in Metastatic Melanoma." *Front. Med.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00027>.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Mohamed Badr, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Morphomolekulare Analyse des Immun-Mikromilieus im Kopf-Hals-Karzinom: selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilsklärung

Publikation 1:

Autoren: Mohamed Badr, Korinna Jöhrens, Michael Allgäuer, Melanie Boxberg, Wilko Weichert, Ingeborg Tinhofer, Carsten Denkert, Peter Schirmacher, Albrecht Stenzinger, Jan Budczies

Titel: Morphomolecular analysis of the immune tumor microenvironment in human head and neck cancer

Zeitschrift: Cancer Immunology Immunotherapy

Erscheinungsdatum: 23.08.2019

Beitrag im Einzelnen: Entwicklung des statistischen Auswertungsplans (zusammen mit PD Dr. Budczies), Histopathologische Auswertung aller virtuellen Objektträger und Bestimmung ieTILs und strTILs (betreut von PD Dr. Jöhrens), Datenanalyse mit SPSS (alle Analysen außer die in Abb. 3 und Abb. 4 dargestellten), Generierung von Tab. 1, Tab. 2, Tab. 3, Abb. 1, Abb. 2, Suppl. Tab. 1, Suppl. Abb. 1 und Suppl. Abb. 2, Beitrag zur Diskussion der Daten, Beitrag zum Manuskripttext und Kommentierung der finalen Version des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

ISI-Web-Liste

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“ONCOLOGY”** Selected Category Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 222 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS	28,839	244.585	0.066030
2	NATURE REVIEWS CANCER	50,407	42.784	0.079730
3	LANCET ONCOLOGY	44,961	36.418	0.136440
4	JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY	156,474	26.303	0.285130
5	Nature Reviews Clinical Oncology	8,354	24.653	0.026110
6	Cancer Discovery	11,896	24.373	0.065350
7	CANCER CELL	35,217	22.844	0.096910
8	JAMA Oncology	5,707	20.871	0.027770
9	ANNALS OF ONCOLOGY	38,738	13.926	0.095780
10	JNCI-Journal of the National Cancer Institute	37,933	11.238	0.052550
11	Journal of Thoracic Oncology	15,010	10.336	0.033280
12	CLINICAL CANCER RESEARCH	81,859	10.199	0.132210
13	SEMINARS IN CANCER BIOLOGY	6,330	10.198	0.010740
14	LEUKEMIA	25,265	10.023	0.059580
15	NEURO-ONCOLOGY	10,930	9.384	0.030350
16	Cancer Immunology Research	4,361	9.188	0.021180
17	CANCER RESEARCH	139,291	9.130	0.130190
18	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	1,675	8.374	0.007130
19	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-REVIEWS ON CANCER	5,276	8.220	0.009300
20	Blood Cancer Journal	1,804	8.125	0.007660
21	CANCER TREATMENT REVIEWS	7,870	8.122	0.015820
22	Molecular Cancer	10,301	7.776	0.017280
23	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER	51,800	7.360	0.071870
24	Journal of Hematology & Oncology	4,098	7.333	0.009750

25	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER	29,883	7.191	0.050170
26	ONCOGENE	66,411	6.854	0.075960
27	CANCER	68,221	6.537	0.074740
28	CANCER LETTERS	29,311	6.491	0.042280
29	Journal of the National Com- prehensive Cancer Network	5,143	6.471	0.017530
30	Advances in Cancer Research	2,343	6.422	0.003690
31	JOURNAL OF PATHOLOGY	16,156	6.253	0.024060
32	Therapeutic Advances in Medical Oncology	1,020	6.238	0.002650
33	JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH	5,661	6.217	0.008740
34	BREAST CANCER RESEARCH	11,022	6.142	0.020000
35	Pigment Cell & Melanoma Research	4,430	6.115	0.007840
36	Clinical Epigenetics	2,172	6.091	0.007720
37	CANCER AND METASTASIS REVIEWS	6,106	6.081	0.006870
38	BRITISH JOURNAL OF CANCER	46,723	5.922	0.065130
39	STEM CELLS	21,694	5.587	0.035680
40	INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS	46,595	5.554	0.055060
41	OncoImmunology	5,963	5.503	0.020500
42	MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS	19,211	5.365	0.031690
43	ENDOCRINE-RELATED CANCER	7,114	5.331	0.012410
44	Cancers	3,897	5.326	0.008990
45	ONCOLOGIST	11,433	5.306	0.020480
46	Molecular Oncology	4,529	5.264	0.013160
47	CARCINOGENESIS	21,776	5.072	0.021960
48	Gastric Cancer	4,290	5.045	0.006460
49	NEOPLASIA	6,801	4.994	0.008860
50	SEMINARS IN ONCOLOGY	5,409	4.942	0.007270
52	CELLULAR ONCOLOGY	1,322	4.761	0.002020
53	Oncogenesis	1,348	4.722	0.004480
54	ORAL ONCOLOGY	8,949	4.636	0.013760

55	Cancer Biology & Medicine	816	4.607	0.002330
56	MOLECULAR CANCER RESEARCH	7,834	4.597	0.013490
57	JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH PART C- ENVIRONMENTAL CARCINOGENESIS & ECOTOXICOLOGY REVIEWS	895	4.586	0.000810
58	CANCER EPIDEMIOLOGY BIOMARKERS & PREVENTION	19,976	4.554	0.029440
59	GYNECOLOGIC ONCOLOGY	23,652	4.540	0.034310
60	Journal of Oncology	1,573	4.528	0.002410
61	BONE MARROW TRANSPLANTATION	12,506	4.497	0.020810
62	CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY HEMATOLOGY	6,956	4.495	0.012190
63	LUNG CANCER	11,340	4.486	0.019070
64	Frontiers in Oncology	6,599	4.416	0.024250
65	CANCER SCIENCE	11,994	4.372	0.016230
66	CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY	7,509	4.225	0.012830
67	Clinical Lung Cancer	2,360	4.204	0.005450
68	PROSTATE CANCER AND PROSTATIC DISEASES	2,022	4.099	0.004890
69	CANCER GENE THERAPY	2,928	4.044	0.003610
70	SEMINARS IN RADIATION ONCOLOGY	2,480	4.027	0.003620
71	Cancer Prevention Research	5,348	4.021	0.011930
72	American Journal of Cancer Research	3,246	3.998	0.008250
73	Cancer Cell International	2,393	3.960	0.004960
74	Targeted Oncology	1,008	3.877	0.002560
75	CANCER CYTOPATHOLOGY	2,544	3.866	0.004380
76	Clinical Colorectal Cancer	1,264	3.861	0.002620

Publikation

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02378-w>

Autoren: Mohamed Badr, Korinna Jöhrens, Michael Allgäuer, Melanie Boxberg, Wilko Weichert, Ingeborg Tinhofer, Carsten Denkert, Peter Schirmacher, Albrecht Stenzinger, Jan Budczies

Titel: Morphomolecular analysis of the immune tumor microenvironment in human head and neck cancer

Zeitschrift: Cancer Immunology Immunotherapy

Erscheinungsdatum: 23.08.2019

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Titel: Morphomolecular analysis of the immune tumor microenvironment in human head and neck cancer

Autoren: Mohamed Badr, Korinna Jöhrens, Michael Allgäuer, Melanie Boxberg, Wilko Weichert, Ingborg Tinhofer, Carsten Denkert, Peter Schirmacher, Albrecht Stenzinger, Jan Budczies.

Publikationsort: Cancer Immunology Immunotherapy 68, 1443-1454(2019)

Publikationsjahr: 2019

IF: 4,9

Danksagung

Recht herzlich bedanke ich mich bei den Menschen, die mir in verschiedenen Bereichen bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jan Budczies für die Unterstützung und Hilfe während der Erarbeitung meiner Dissertation. Er war der Ideengeber dieser Arbeit. Ich danke Ihm auch für die langen intensiven Gespräche, die dazu beitrugen, die Arbeit zu realisieren.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Korinna Jöhnes, die mich bei der Auswertungen der pathologischen Schnitte betreut hat.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinen Weg durch diese Dissertation begleitet haben.

Zuletzt möchte ich mich bei all jenen bedanken, die auf ihre Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.