

Gewebständige T-Gedächtniszellen in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med. dent.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Dahlia Luisa Kittel

aus Unna

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Marieta Ioana Toma
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Franz-Josef Kramer

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2026

Aus dem Institut der Pathologie

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung.....	9
1.1	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches	9
1.1.1	Epidemiologie	9
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	10
1.1.3	Präkanzerosen	11
1.1.4	Symptome und Diagnostik	14
1.1.5	Tumorstadium	15
1.1.6	Therapie	15
1.1.6.1	Die operative Therapie	16
1.1.6.2	Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI).....	17
1.2	Tumormikroenvironment	21
1.2.1	Tumorassoziierte Lymphozyten (TILs).....	22
1.2.2	CD8-positive Lymphozyten	22
1.2.3	CD69 als Aktivierungsmarker	23
1.2.4	CD103.....	24
1.2.5	PD-1: Das Zielmolekül für Immuncheckpointtherapie	25
1.3	Fragestellung der Arbeit.....	25
2.	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	Verwendete Tumorproben	27
2.1.2	Geräte	27
2.1.3	Software	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Tissue-Microarrays (TMAs) und immunhistochemische Färbung	28
2.2.2	Auswertung der Daten	29

2.2.2.1	QuPath Software	29
2.2.2.2	Statistik mittels SPSS	30
3.	Ergebnisse.....	31
3.1	Patientenkohorte	31
3.2	Intratumorale Infiltration der CD8-positiven Lymphozyten	38
3.3	Intratumorale Infiltration von CD69-positiven Immunzellen	38
3.4	Intratumorale Infiltration von CD103-positiven Immunzellen	39
3.5	PD-1-Expression in intratumoralen Immunzellen.....	40
4.	Diskussion	42
4.1	CD8 Expression in HNSCC	42
4.2	CD69 Expression in HNSCC	43
4.3	Die Rolle positiver CD103 Zellen in HNSCC	45
4.4	PD-1 Expression auf den Immunzellen in HNSCC	47
5.	Zusammenfassung	50
6.	Abbildungsverzeichnis.....	51
7.	Tabellenverzeichnis	53
8.	Literaturverzeichnis	54
8.1	Literatur.....	54
8.2	Internetquellen	68
9.	Anhang.....	69
10.	Erklärung zum Eigenanteil	75
11.	Danksagung	76

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierenden Zellen
Anti-EGFR-Therapie	Anti-epidermal growth factor receptor Therapie
CPS	Combined Positive Score
CT	Computertomographie
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CXCL13	C-X-C motif chemokine ligand 13
EBV	Epstein-Barr-Virus
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillomvirus
ICI	Immun-Checkpoint-Inhibitoren
LAG-3	Lymphocyte-Activation gene 3; Protein auf Oberflächen von Zellen, Immuncheckpointrezeptor
MHC-1	Haupthistokompatibilitätskomplex 1
MRT	Magnetresonanztomographie
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OLP	Oraler Lichen planus
OPSCC	Oropharyngeal Squamous cell carcinoma
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PEC	Plattenepithelkarzinom
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie
pN	post operative pathohistologische Klassifikation des Lymphknotenstatus des Tumors
pT	post operative pathohistologische Klassifikation der Größe des Tumors
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TCR	Thymus-cell-receptor positive
TCGA-Datenbank	The Cancer Genome Atlas-Datenbank
TIL	Tumorerinfiltrierende Lymphozyten

TMA	Tissue microarray
TME	Tumor-Mikroumgebung/Tumormicroenvironment
TIM-3	hepatitis A virus cellular receptor 2; Oberflächenprotein, das auf T-Zellen, Treg, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird
TP53-Mutationen	tumor protein p53; häufigste mutierte Gen in menschlichen Tumoren
TRM	Tissue resident memory T Cells
UICC-TNM	Union Internatinalre Contre le Cancer

1. Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) umfassen maligne Tumore der Mundhöhle, des Larynx und des Pharynx. Bei dieser Erkrankung handelt es sich weltweit um die häufigste Tumorentität der Mundhöhle, die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Chamoli et al., 2021). Die 5 Jahres-Überlebensrate liegt bei 63 % (Reyes-Gibb et al., 2014, American Cancer Society, Inc., Surveillance Research, 2011). Plattenepithelkarzinome zeichnet ein destruierendes Wachstum sowie eine Neigung zur Metastasierung aus. Hierbei erfolgt die Metastasierung zunächst in die lokoregionären Lymphknoten des Halses, im späteren Verlauf können auch Fernmetastasen auftreten (Johnson et al., 2020; Walsh et al., 2007).

1.1.1 Epidemiologie

2018 erkrankten 890.000 Menschen weltweit an PEC des Kopf-/Halsbereiches und von diesen verstarben circa 450.000. Somit handelt es sich um die sechst häufigste Tumorentität weltweit (Ferlay et al., 2019). Zudem steigt die Inzidenz der Erkrankung stetig und es wird angenommen, dass im Jahr 2030 über 1 Million neue Fälle pro Jahr auftreten werden. Dies stellt einen Anstieg der Fallzahlen um 30 % dar (Johnson et al., 2020).

Geschlechterspezifisch sind Männer zwei bis vier Mal häufiger von HNSCC betroffen als Frauen. Im Jahr 2018 wurden in Deutschland bei Männern etwa 9.820 und bei Frauen etwa 4.490 neue Fälle von Mundhöhlen- und Rachenkarzinomen diagnostiziert (Robert Koch-Institut, 2018). Diese Zahlen entsprechen etwa 2,8 % aller neu diagnostizierten Tumore in Deutschland. Haupterkrankungsalter ist zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr (Robert-Koch-Institut, 2018). Das mittlere Erkrankungsalter bei nicht viraler Ursache liegt bei 66 Jahren, wohingegen bei einer HPV- oder EBV-assoziierten Form das Erkrankungsalter bei circa 50 Jahren liegt (Windon et al., 2018).

Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt trotz moderner und vielfältiger Therapieoptionen bei durchschnittlich 58 % aller Erkrankten. In der Studie von Du et al. (2019) wurde für

Oropharynxkarzinome ein deutlich besseres 5-Jahres-Überleben beobachtet (Oropharynx 63 %, Hypopharynx 33 %). HNSCC weisen eine hohe Mortalität auf, die häufig durch die Bildung von lokoregionären oder Fernmetastasen sowie inoperablen Lokalrezidiven mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber Chemo- oder Strahlentherapien bedingt ist (Coordes et al., 2014).

Die Auswirkungen auf die Lebensqualität der Patienten und ihr soziales Umfeld sind ebenfalls beträchtlich. Sowohl die Erkrankung selbst als auch die Therapie führen zu einer starken Beeinträchtigung der Organfunktion und Ästhetik im Kopf-Hals-Bereich (de Leeuw et al., 2000; de Leeuw et al., 2001). Dies kann unter anderem zur dauerhaften Unfähigkeit der peroralen Nahrungsaufnahme, des Schluckens oder Sprechfähigkeit führen (Nguyen et al., 2005). Erkrankungs- oder operationsbedingte Veränderungen der oberen Atemwege, insbesondere im Bereich der Mundhöhle und des Pharynx, können bei bestimmten Patienten die dauerhafte Anlage eines Tracheostomas erforderlich machen. Des Weiteren zeigt sich bei Kopf-Hals-Karzinomen eine hohe Co-Inzidenz an Depressionen und eine erhöhte Suizidrate im Vergleich zu anderen Tumorarten (Chan JY et al., 2011; Misono et al., 2008).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Entstehung von HNSCC ist ein multifaktorielles Geschehen, zu welchem sowohl endogene Faktoren wie beispielsweise genetische Komponenten als auch exogene Faktoren beitragen (Suárez et al., 2006).

Zu den Hauptrisikofaktoren zählen der Konsum von Tabak und Alkohol. 75 % der HNSCC leiten sich von den zuvor genannten Schadstoffen ab. Der gemeinsame Genuss beider Noxen erhöht das Risiko einer Erkrankung um bis zu mindestens 30-fach (Hayes et al., 1999; Johnson et al., 2020; Lubin et al., 2009; Macfarlane et al., 1995; Pelucchi et al., 2008)

Aber auch virale Infektionen, wie beispielsweise das Humane Papillomavirus (HPV) tragen zur Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms (PEC) bei (Johnson et al., 2020). Diese Infektionen werden laut Hammarstedt und Dayyani mit circa 70 % der oropharyngealen und 30 % der Kopf-Hals-Karzinome assoziiert (Dayyani et al., 2010; Hammarstedt et al., 2006). Bei den HP-Viren handelt es sich um Erreger, die von Mensch zu

Mensch übertragen werden. Die Inzidenz von HNSCC stieg in den letzten Jahren vor allem bei den Betroffenen unter dem 50. Lebensjahr. Dennoch ist die Überlebensrate und damit auch die Wahrscheinlichkeit eines positiven Outcomes bei Patienten mit HPV-Infektion besser einzuschätzen als bei HPV-negativen Karzinomen (Johnson et al., 2020). Auch spielen regionale Besonderheiten hinsichtlich der Ernährungsweise eine Rolle. Studien zeigen, dass der Konsum der Betelnuss in asiatisch-pazifischen Regionen zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko oraler Karzinome führt (Johnson et al., 2020). Eine gesunde, vor allem mediterrane, Ernährung mit ausreichend Gemüse und Zitrusfrüchten soll hingegen einen positiven Faktor für das Risiko eines Karzinoms verkörpern (Bosetti et al., 2003).

1.1.3 Präkanzerosen

Bedeutende Haut- und Schleimhautveränderungen innerhalb der Mundhöhle stellen unter anderem Leukoplakien, Erythroplakien und der Lichen ruber dar (Abai et al., 2020; Johnson et al.).

Die Leukoplakie wird von der WHO beschrieben als ein weißlicher Fleck der oralen Schleimhaut, der nicht abgewischt werden kann und keiner anderen Pathologie zugehörig ist (Abai et al., 2020). Bei dieser handelt es sich um eine fakultative Präkanzerose, die mit geringer Wahrscheinlichkeit zu einer Entartung und damit zu einer Karzinomentstehung führen kann (Zhu et al., 2021). Die Häufigkeit einer Leukoplakie wird mit 1-2,6 % eingestuft, wobei Männer ein höheres Erkrankungsrisiko als Frauen haben. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung zwischen dem 5.-7. Lebensjahrzehnt am stärksten erhöht (Bewley und Farwell, 2017).

Klinisch wird die Leukoplakie in zwei Gruppen eingeteilt. Eine flache und gleichmäßige Erscheinungsform mit durchgehender, einheitlicher Textur wird als homogene Leukoplakie bezeichnet. Unter der nicht-homogenen Leukoplakie versteht man eine meist weißliche oder rot-weißliche Schleimhautveränderung, die eine unregelmäßige Oberfläche aufweist und auch Ulzerationen umfassen kann. Diese können durch knotige oder warzenartige Texturen gekennzeichnet sein (Lodi et al., 2016).



Abb. 1: Beispiel einer homogenen Leukoplakie der Wangenschleimhaut (Kreppel, 2011)

Die Erythroplakie ist eine relativ selten auftretende, rötlich gefärbte Läsion der Schleimhaut, die sowohl klinisch als auch histopathologisch wie die Leukoplakie einzuordnen ist. Diese hat ein hohes Entartungspotential (Holmstrup, 2018). Das Erkrankungsrisiko liegt laut einer indischen Studie bei 0,2 %, global betrachtet ist ein Risiko von 0,02 bis 0,83 % wahrscheinlich. Innerhalb der Mundhöhle sind meist sowohl der Weichgaumen, der Mundboden und die bukkale Schleimhaut betroffen (Reichart und Philipsen, 2005).

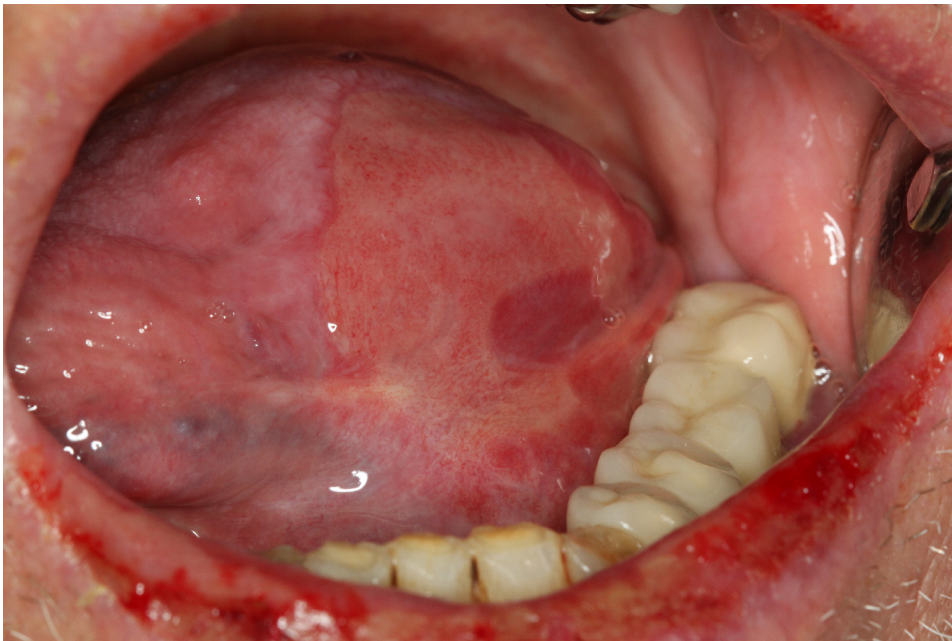


Abb. 2: Beispiel einer Erythroplakie an der Zunge (Mundschleimhautsprechstunde der zahnärztlichen Oralchirurgie des Universitätsklinikums Bonn, 2024)

Eine weitere prä maligne Schleimhautveränderung ist der orale Lichen ruber planus (OLP). Bei diesem handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung, die durch wiederkehrende Phasen von Symptomen und Ruhephasen gekennzeichnet ist und bei der oralen Manifestation nicht von alleine abklingt (Eisen et al., 2005).

Innerhalb der Gesellschaft sind circa 0,5-2 % von einem oralen Lichen planus betroffen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 3. und 6. Lebensjahrzehnt, wobei Frauen doppelt so häufig wie Männer erkranken. Die typische Lokalisation der Immunerkrankung zeigt sich als eine bilaterale symmetrische Manifestation der bukkalen Schleimhaut. Aber auch die Zunge, Gingiva und labiale Mucosa sind Prädilektionsstellen des OLP (Mollaoglu, 2000).

Das Progressionsrisiko des OLP ist laut einer Studie von Gandolfo gering. Weibliche Patienten mit einer prä malignen Form des OLP entwickelten zu ca. 3 %, Männer sogar nur zu 1,3 % einen OLP (Gandolfo et al., 2004).



Abb. 3: Beispiel eines oralen Lichen planus im Vestibulum (Mundschleimhautsprechstunde der zahnärztlichen Oralchirurgie des Universitätsklinikums Bonn, 2024)

1.1.4 Symptome und Diagnostik

Da HNSCC im Anfangsstadium häufig asymptomatisch sind und von den Patienten nur selten selbst erkannt werden, sind den behandelnden Zahnärzten, HNO-Ärzten und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen eine wichtige Rolle zugeschrieben. Diese kontrollieren systematisch mittels Inspektion und Palpation, sowohl extra- als auch intraoral, die Haut bzw. Schleimhaut der Patienten auf Abnormalitäten bzgl. Farbe, Form, Beschaffenheit der Gewebe, Ulzeration oder Erosionen.

Folgende Symptome sind malignitätssuspekt (S2k-Leitlinie der DGMKG, Stand: September 2019):

- Verlust des Oberflächenglanzes
- Verhornungstendenz (weiße Läsionen/Leukoplakie)
- flächiger Verlust der Oberflächenintegrität (rote Läsionen/Erythroplakie)
- Erosion
- Ulzeration
- Blasenbildung/Desquamation

- Induration
- Atrophie
- Pigmentierung
- Schmerzsensation, Brennen

Ein klinisch auffälliger und malignitätssuspekter Befund wird in der Regel durch eine Probeexzision entnommen und anschließend histopathologisch auf Malignität geprüft.

Zur Untersuchung der Tumorausbreitung können zum Mittel der Wahl zum einen die Panoramaschichtaufnahme (OPG), der Ultraschall und zum anderen ein CT oder MRT des Kopf-Hals-Bereiches (Vidiri et al., 2007) angefertigt werden. Ein weiteres Diagnostikmittel über die beiden Standardverfahren hinaus, bietet die Positronen-Emissions-Tomographie (PET-CT). Diese eignet sich zur Detektion von Zweitkarzinomen, Lymphknoten- oder Fernmetastasen oder bei Rezidiven (Murtojärvi et al., 2022).

1.1.5 Tumorstadium

Für maligne Tumore im Kopf-Hals-Bereich erfolgt die Einteilung des Schweregrades anhand einer UICC-TNM-Klassifikation.

Das Tumorstadium beschreibt die Ausbreitung des Primärtumors sowie den Befall von Lymphknoten oder anderen Organen in Form von Metastasen.

Ins T-Stadium fließt die Tumorgöße sowie die Infiltration wichtiger Nachbarstrukturen, z.B. Kortikalisarrosionen ein. Das Nodalstadium definiert, ob und wie viele Lymphknoten befallen sind, auch gibt sie Auskunft über die Größe der Lymphknoten sowie der extranodalen Ausdehnung der Metastase.

Weitergehend gibt es Unterschiede bei p16-positiven/p16-negativen Oropharynxkarzinomen.

1.1.6 Therapie

Die Behandlung des Mundhöhlenkarzinoms umfasst einen interdisziplinären Ansatz und richtet sich nach den aktuellen Leitlinien. Zur kurativen Behandlung von HNSCC kommen

entweder eine alleinige chirurgische Therapie oder ein kombiniertes Vorgehen mit chirurgischem Eingriff und einer adjuvanten bzw. neoadjuvanten Radio- und/oder Chemotherapie in Betracht. Die Entscheidung für ein bestimmtes Therapiekonzept richtet sich in der Regel nach der Lokalisation und dem Tumorstadium sowie dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten. Das Ziel besteht darin, eine lokale Tumorfreiheit bzw. -kontrolle zu erreichen, während die funktionellen und ästhetischen Beeinträchtigungen des Patienten möglichst gering gehalten werden.

Palliativ kann eine Kombination aus platinbasierter Chemotherapie mit Cetuximab eingesetzt werden sowie eine anti-EGFR-Therapie (S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, 2021).

1.1.6.1 Die operative Therapie

Therapeutisch gilt die vollständige Resektion des PEC als Mittel der Wahl. Ist dies nicht zu erzielen, verschlechtert sich die Prognose (Parsons et al., 1997).

Abhängig von Größe und Lage des Defekts kommen unterschiedliche rekonstruktive Verfahren zum Einsatz. Kleinere Defekte lassen sich häufig primär verschließen oder mittels lokaler Verschiebelappen sowie durch autologe Voll- oder Spalthauttransplantationen versorgen. Bei größeren Defekten sind komplexere rekonstruktive Maßnahmen erforderlich. In solchen Fällen kann eine Deckung beispielsweise durch muskelgestielte Lappen wie den Pectoralis-Major-Lappen oder durch freie mikrovaskulär reanastomosierte Gewebetransplantate erfolgen, die unter anderem aus der Scapula, dem radialen Unterarm oder dem oberen bzw. unteren Extremitätenskelett entnommen werden (Azizzadeh et al., 2001; Castelli et al., 2001; Zaker Sharak et al., 2014). Bei über 50 % der Patienten mit HNSCC liegt eine Metastasierung in den regionalen Lymphknoten vor und indiziert eine zervikale Lymphknotendissection. Unterschieden wird zwischen der radikalen und elektiven Neck Dissection.

Die radikale Neck Dissection umfasst sowohl die Entfernung aller Halslymphknoten aus den Leveln I-V als auch die Entfernung anatomischer Strukturen wie den Musculus stern-

ocleidomastoideus, die Vena jugularis interna sowie den Nervus accessorius. Eine radikale Entfernung bietet mehr diagnostische Sicherheit, allerdings leiden die Patienten durch die Entfernung der wichtigen anatomischen Strukturen, die wiederum bei einer elektiven Neck Dissection erhalten bleiben, unter einem Verlust an Lebensqualität (Chisa, 2006). Die selektive Neck Dissection ist indiziert für Patienten mit guter Prognose und Metastasierung, die sich auf wenige Level beschränkt. Hierbei werden nur die Lymphknotenlevel reseziert, in denen eine Metastasierung aufgrund der Tumorlokalisation und Lymphabflusswege wahrscheinlich ist (D’Cruz et al., 2015; Kowalski und Sanabria, 2007).

1.1.6.2 Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI)

Die Immunantwort des Körpers spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle und Eliminierung von malignen Zellen. Eine wichtige Regulation dieser Antwort erfolgt über sogenannte Immun-Checkpoints – inhibitorische Signale, die verhindern, dass T-Zellen überschießend oder autoreaktiv agieren. Exprimieren Tumorzellen diese Oberflächenmoleküle, können diese TILs hemmen. Zu den wichtigsten Checkpoints gehören der Programmed Death-1 (PD-1)-Rezeptor und sein Ligand Programmed death-ligand 1 (PD-L1) sowie CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4) (Pardoll, 2012). ICI werden vielseitig in der onkologischen Therapie eingesetzt. Das maligne Melanom war beispielsweise lange Zeit durch eine schlechte Prognose im metastasierten Stadium gekennzeichnet. Mit der Einführung von ICIs hat sich das therapeutische Paradigma grundlegend verändert. Mit ICIs liegt das Überleben bei 7,5 Monaten (Ferris et al., 2016). Durch die Blockade inhibitorischer Rezeptoren, wie CTLA-4 und PD-1, wird die anti-tumorale Aktivität von T-Zellen reaktiviert (Sharma und Allison, 2015).

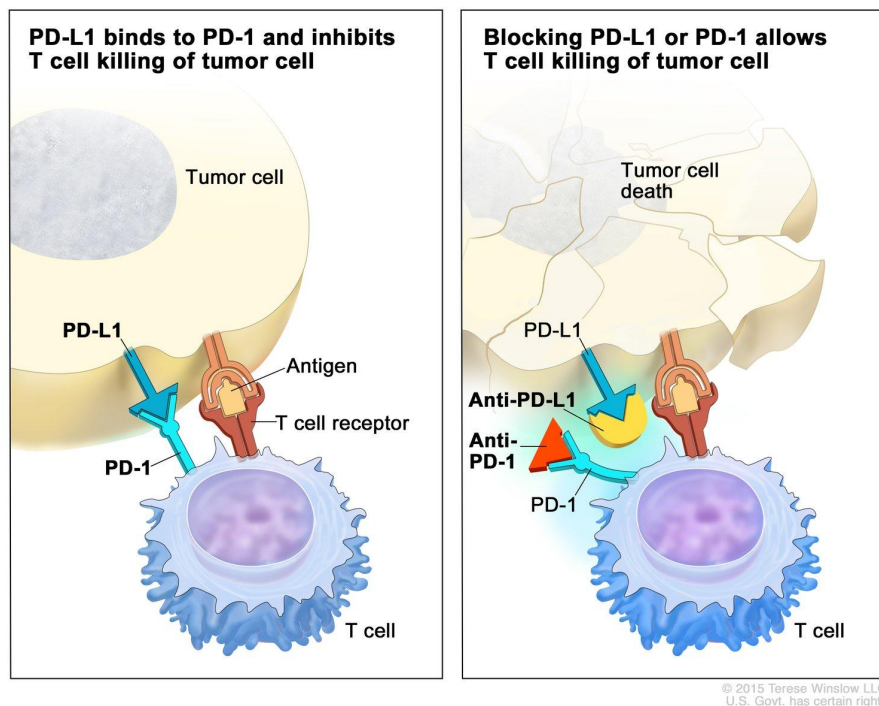


Abb. 4: ICI und dessen Funktionsweise (National Cancer Institute, 2015)

Tumore können PD-L1 exprimieren, welches über eine Bindung von PD-1 T-Zellen hemmt, die einen anti-tumor Effekt haben können. PD-L1-Inhibitoren zielen auf das Transmembranprotein PD-L1 ab. Diese binden an PD-1-Rezeptoren auf T-Zellen und unterstützen die immunologische Toleranz, indem die Aktivität zytotoxischer T-Zellen reduziert wird. Kommt es zu einer Inhibition von PD-L1, erhöht sich die Aktivität des Immunsystems gegen Tumorgewebe und es kann langfristig zu einem längeren Gesamt- und progressionsfreien Überleben führen (Johnson et al., 2023; Park et al., 2022).

Die Immuncheckpoint-Blockade gegen PD-1 hat sich als Standardtherapie für rezidivierende oder metastasierende HNSCC etabliert (Cohen et al., 2019). Die Tumorzellen in HNSCC weisen eine vergleichsweise hohe Expression von PD-L1 auf und befinden sich in einem Zustand der Immunevasion. Besonders ausgeprägt ist die PD-L1-Expression bei HNSCC, die mit anhaltenden Virusinfektionen wie HPV oder EBV in Verbindung stehen (Badoual et al., 2013; Lyford-Pike et al., 2013). In der Monotherapie zeigen sich jedoch

nur wenig signifikante Erfolge. Die Zwei-Jahres Überlebensrate der behandelten Patienten liegt bei 17-27 % (Vos et al., 2021).

Ipilimumab, ein monoklonaler Antikörper gegen CTLA-4, war der erste ICI, der 2011 für die Behandlung des metastasierten Melanoms zugelassen wurde (Mansh, 2011). Eine Zulassung für HNSCC steht weiterhin aus.

Nivolumab wird als Arzneimittel in der Krebstherapie seit November 2016 verwendet (Schwab et al., 2018). Dieser blockiert den PD-1-Rezeptor auf T-Zellen, wodurch die hemmende Wirkung von PD-L1 aufgehoben wird. Durch die Hemmung von PD-1 wird die T-Zell-Aktivität gegen Tumorzellen verstärkt, da die tumorspezifische Immunsuppression aufgehoben wird (Ferris et al., 2016). 2014 konnte in der Phase-III-Studie „CheckMate141“ gezeigt werden, dass die Therapie bei HNSCC-Lokalrezidiven mit Nivolumab verglichen mit der Standardtherapie ein verbessertes Gesamtüberleben zeigt - 7,5 Monaten mit Nivolumab, verglichen mit 5,1 Monaten bei der Standardtherapie (Ferris et al., 2016). Auch für Pembrolizumab konnte eine Verlängerung des Gesamtüberlebens für HNSCC-Patienten mit Progress oder Metastasierung demonstriert werden (KEYNOTE 040, Harrington et al., 2021).

Besonders effektiv erwies sich die Kombinationstherapie aus Nivolumab und Ipilimumab. Ipilimumab richtet sich gegen CTLA-4 auf T-Zellen und inhibiert diese. Somit wird die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen im Frühstadium der Immunantwort gefördert (Harrington et al., 2023). Die Kombinationstherapie führt zu besseren Langzeitergebnissen mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 52 % bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Melanom (Larkin et al., 2019). Auch Hodi et al. (2016) zeigten auf, dass die kombinierte Therapie aus beiden Präparaten eine bessere Wirksamkeit bei gleichzeitig geringerer Toxizität aufweist.

Dennoch gibt es auch Patienten, die schlechter auf ICIs ansprechen. Die Gründe dafür sind multifaktoriell. Unter anderem liegt dies an einer geringeren PD-L1-Expression. Die CheckMate141-Studie und KEYNOTE040-Studie belegen ein besseres Ansprechen auf ICIs bei PD-L1 und einem Combined Positive Score (CPS) von ≥ 1 oder ≥ 20 . Demnach

gilt, je mehr immunaktive Zellen mit PD-L1-Expression im Tumorgewebe, desto besser das Ansprechen auf PD-1 Inhibitoren wie Pembrolizumab (Burtneß et al., 2019, Ferris et al., 2016). Darüber hinaus sorgt eine immunsuppressive Tumorumgebung für ein reduziertes Ansprechen gegenüber monoklonalen Antikörpern. Induziert wird dies durch regulatorische T-Zellen (Tregs) und TAMs, die die T-Zell Aktivität hemmen (Mantovani et al., 2019).

Eine andere Möglichkeit für ein schlechtes Ansprechen auf einen ICI kann ein sogenannter immunologisch „kalter“ Tumor sein. In diesem liegen Tumore ohne Entzündungsreaktion und T-Zellinfiltration vor. Durch die nicht vorhandenen zytotoxischen T-Zellen fehlt das Ziel für ICIs (Wang et al., 2019). Die TILs dienen als Biomarker für Immunreaktionen, indem die Dichte von CD8⁺TILs mit einem besseren Ansprechen der ICIs korreliert. Insbesondere CD8⁺PD-L1⁺ TILs gelten als Zeichen einer tumorreaktiven Antwort. Zudem sezernieren diese Zytokine, die die Karzinomzellen für das Immunsystem sichtbar machen (Zhang et al., 2021).

Zentraler Mechanismus der Immunevasion in der Mikroumgebung von HNSCC stellt die Erschöpfung tumorinfiltrierender T-Zellen, genannt „T cell exhaustion“, dar. Charakteristisch für diesen Zustand ist eine persistente Antigenexposition, die zu einer progressiven funktionellen Dysregulation zytotoxischer CD8⁺-T-Zellen führt. Ermüdete T-Zellen weisen eine verminderte Proliferationsfähigkeit, eine reduzierte Zytokinproduktion sowie eine gesteigerte Expression inhibitorischer Rezeptoren wie PD-1, TIM-3, LAG-3 und TIGIT auf (Wherry und Kurachi, 2015; Thommen und Schumacher, 2018). Obwohl ICIs wie Nivolumab oder Pembrolizumab gezielt PD-1/PD-L1-Signale blockieren und so die T-Zell-Aktivität reaktivieren sollen, ist deren Wirksamkeit bei HNSCC häufig durch das Ausmaß der T-Zell-Ermüdung limitiert. Studien belegen, dass ein hoher Grad an funktionell erschöpften T-Zellen mit einem schlechteren Therapieansprechen und einer ungünstigeren Prognose assoziiert ist (Zhang et al., 2022).

In einer klinischen Auswertung zur Sicherheit der Immuncheckpoint-Inhibition mit Nivolumab bei Patienten mit HNSCC zeigte sich ein insgesamt günstiges Nebenwirkungsprofil. Unerwünschte Ereignisse traten bei 80 % der Patienten auf, während schwerwiegende

Nebenwirkungen (Grad 3–4) lediglich in 8 % der Fälle beobachtet wurden. Die häufigsten therapieassoziierten Nebenwirkungen umfassten Fatigue (31 %), Pruritus und Hautausschläge (jeweils 18 %) sowie Arthralgien und Hypothyreose (je 13 %). Diese Nebenwirkungen sind charakteristisch für immunvermittelte Reaktionen unter einer PD-1-Blockade und traten überwiegend in milder Form auf. Schwerwiegende Nebenwirkungen wie Diarrhoe Grad 3, orale Mukositis und ausgeprägte Arthralgien wurden mit jeweils 3 % nur vereinzelt beobachtet. Das Nebenwirkungsspektrum wurde vor allem durch endokrine Störungen wie Hypothyreose, kutane Reaktionen und grippeähnliche Allgemeinsymptome geprägt. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse die gute Verträglichkeit von Nivolumab bei HNSCC, was die Substanz insbesondere im palliativen Setting mit Blick auf die Lebensqualität als geeignete Therapieoption unterstreicht (Leddon et al., 2022).

1.2 Tumormikroenvironment

Tumore entwickeln während ihrer Entstehung und dem Entwicklungsprozess spezifische Mikro-Umgebungen, die sich stark von denen normaler Gewebe unterscheiden. Das Tumormikroumfeld (TME) bildet dabei eine Art Nährboden für Krebszellen und hat zudem erheblichen Einfluss auf die Entstehung und das Wachstum von Tumoren. Eine saure Umgebung, hohe Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Glutathion (GSH), ein hoher Hypoxie-Status, übermäßige Enzymexpression und hohe ATP-Spiegel sind charakteristisch für das TME, was auf die rasche Zellteilung und den Stoffwechsel der Tumore zurückzuführen ist. Demnach fördert dieses Umfeld nicht nur die Angiogenese und Metastasierung der Tumore. Im TME sind tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) eine der am häufigsten vorkommenden Zelltypen und haben einen wesentlichen Einfluss auf die Tumorentwicklung (Wanderley et al., 2018). Diese machen einen erheblichen Anteil der infiltrierenden Leukozyten aus und stehen innerhalb des Karzinoms mit einer Zunahme der Tumorzellzahl in Verbindung (Kumar et al., 2017). Darüber hinaus kann dieses auch zu einer Resistenz gegenüber Behandlungen und einem potentiellen Versagen der Therapie führen. Aufgrund dieser Eigenschaften ist das TME zu einem wichtigen Ziel in der Krebsbehandlung geworden und wird häufig genutzt, um die Freisetzung von Medikamenten in der Immuntherapie gezielt zu steuern (Peng et. al., 2022).

1.2.1 Tumorassoziierte Lymphozyten (TILs)

Die Wechselwirkung zwischen Krebs- und Immunzellen innerhalb der Tumormikroumgebung (TME) spielt (Hayes et al., 1999) eine zentrale Rolle bei der Regulation des Tumorstwachstums und des Fortschreitens. In diesem Zusammenhang können tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) sowohl im Primärtumorgewebe als auch in tumorbeteiligten Lymphknoten und Metastasen verschiedener Krebsarten nachgewiesen werden (Galon et al., 2006). Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches finden sich TILs sowohl in intratumoralen als auch peritumoralen bzw. stromalen Arealen (Almangush et al., 2022).

Eine Studie von Dasgupta bestätigt die Immuninfiltration als prognostischen Faktor für HNSCC. Hierbei zeigt sich eine Korrelation zwischen dem Anteil von TILs im Stroma und intratumoral sowie der Differenzierung vom Tumor und dem zugehörigen pT-Stadium. Demnach wird ein höheres pT-Stadium mit weniger TILs assoziiert. Zudem korreliert ein höheres Alter der Patienten mit dem pN-Stadium und dem intratumoralen TIL-Niveau (Dasgupta et al., 2022).

1.2.2 CD8-positive Lymphozyten

CD8 ist ein Zelloberflächenmolekül und wird von T-Zellen exprimiert. CD8⁺ T-Zellen und auch zytotoxische T-Zellen binden an MHC-1-Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und Zielzellen, die antigene Peptidfragmente präsentieren (Raskov et al., 2021). Es zeigt sich, dass CD8⁺ Zellen bzw. TILs für die Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen zuständig sind (Liu et al., 2022).

In Tumoren von HPV-positiven HNSCC-Patienten weisen CD8⁺ T-Zellen höhere PD-1-Expressionen als in HPV-Negativen auf (Vaddepally et al., 2020). Zudem ist die Häufigkeit von T-Zellen, die PD-1 exprimieren in Tumorgeweben höher als im peripheren Blut von HNSCC-Patienten sowie von gesunden Individuen (Lee et al., 2019). HPV fördert die Expression von PD-L1, was zu einer Immunevasion und der Persistenz dieser Viren führt (Qi et al., 2017).

Mehrere Studien belegen zudem, dass eine hohe Infiltration von CD103⁺CD8⁺ TILs mit einem signifikant besseren Ansprechen auf ICI-Therapien sowie mit einem verlängerten progressionsfreien und Gesamtüberleben bei HNSCC korreliert. So zeigte eine Analyse von Ren et al. (2023), dass Patienten mit hoher CD103⁺-TIL-Dichte unter PD-1-Blockade eine deutlich verbesserte Immunantwort entwickelten. Die gezielte Analyse von CD103⁺ Zellen im Tumorgewebe mittels Immunhistochemie oder multiplexer Immunfluoreszenz könnte künftig eine präzisere Patientenselektion für ICI-Therapien ermöglichen und somit zur Individualisierung immunonkologischer Behandlungsstrategien beitragen. Insgesamt weisen CD103⁺CD8⁺ TILs sowohl immunbiologisch als auch klinisch auf einen funktionell aktiven, tumorreagierenden Immunzellpool hin und sind ein vielversprechender Biomarker für das Therapieansprechen auf PD-1-Inhibitoren in HNSCC.

1.2.3 CD69 als Aktivierungsmarker

CD69 ist ein homodimeres Protein und befindet sich auf den Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen). CD69 wird auf T-Lymphozyten schnell exprimiert, sobald diese durch TCR/CD3, aktivierende Zytokine oder polyklonale mitogene Reize stimuliert werden. Bereits 30 bis 60 Minuten nach der Aktivierung lässt sich die transkriptionelle Expression des CD69-Gens nachweisen, jedoch sinkt sie nach vier bis sechs Stunden wieder deutlich. Das Protein CD69 kann etwa zwei bis drei Stunden nach der Stimulation detektiert werden (Cibrián et al., 2017, Testi et al., 1994).

Daher wird CD69 auch als „Aktivierungsmarker“ bezeichnet. CD69 wird bei verschiedenen chronischen Entzündungen beim Menschen auf infiltrierenden Leukozyten in entzündeten Geweben exprimiert, wie beispielsweise bei rheumatoider Arthritis, systemischer Sklerose, allergischem Asthma und atopischer Dermatitis. Frühe Forschungen mit CD69-defizienten Zellen konnten die Rolle von CD69 bei der Proliferation und Aktivierung von T-Lymphozyten nicht eindeutig klären. In-vivo-Experimente, bei denen CD69-defiziente Mäuse und blockierende Antikörper eingesetzt wurden, haben jedoch gezeigt, dass die CD69-Expression den Schweregrad verschiedener Entzündungsmodelle bei Mäusen beeinflusst, darunter unter anderem Arthritis, Asthma, Myokarditis, Erregerbeseitigung und Tumormunität (Cibrián und Sánchez-Madrid, 2017).

Die Aktivierung von T-Zellen und die Hochregulation des Oberflächenmarkers CD69 spielen eine entscheidende Rolle für ihre Migration und Präsenz innerhalb inflammatorischer Gewebe. Bei Fortschreiten des Karzinoms zeigt sich eine erhöhte Expression von CD69 auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, eine verminderte Infiltration von T-Zellen in das Tumorgewebe und darüber hinaus eine Reduktion von CD8⁺-T-Zellen. Dies wiederum führt zur Schwächung der endogenen anti-tumor Immunabwehr. Untersucht wurde dies bei einem Larynx-Karzinom von Starksa et al. (Mita et al., 2018 und Starska et al., 2011).

Als therapeutischer Ansatz, um die Immunantwort gegen den Tumor zu stärken und demnach auch das Fortschreiten der karzinogenen Entität auszubremsen, bietet sich eine CD69-Antikörper Behandlung an. Diese führt zu einem Anstieg der tumorinfiltrierenden CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen. Demnach könnte CD69 als potentielle Angriffspunkt einer immuntherapeutischen Strategie bei Tumorerkrankung dienen (Mita et al., 2018).

1.2.4 CD103

CD103 ist ein heterodimerer transmembraner Oberflächenrezeptor, der auf unterschiedlichen Zelltypen des Immunsystems zu finden ist und von Epithel-assoziierten T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems ausgebildet wird. Zum Großteil exprimieren CD8⁺ Zellen - zytotoxische T-Zellen oder Tissue resident memory T-Cells (TRM) - sowie CD4⁺ Zellen den Oberflächenrezeptor. Dieser soll über eine Bindung an E-Cadherin die Retention von Lymphozyten in Epithelien generieren. Karzinome sind oft von TRM-Zellen infiltriert, die CD103 exprimieren. Daher wurde beobachtet, dass die CD103-Expression bei bestimmten Tumoren, wie z.B. bei Ovarial-, Zervix- und Kolonkarzinomen mit einer günstigeren Prognose verknüpft sein könnte (Hoffmann, Schön, 2021). Darüber hinaus konnte hervorgebracht werden, dass eine höhere Infiltrationsdichte an CD103⁺ -Zellen in Lungen- und Urothelkarzinomen mit einem besseren Ansprechen auf eine ICI verbunden ist (Corgnac et al., 2020). Eine Studie zeigte, dass das Vorhandensein von CD103⁺ tumorinfiltrierende Lymphozyten eine günstige Verlaufsprognose bei Urothelkarzinomen der Harnblase darstellt (Wang et al., 2015).

Studien von Lai et al. aus 2021 legen dar, dass in Plattenepithelkarzinomen der Haut häufig eine Ko-Expression von CD103⁺ und CD69⁺ auf TRM zu finden ist. In Plattenepithelkarzinomen haben zudem CD69⁺ und CD103⁻ TRMs einen größeren Anteil an der CD3⁺ Population als im Blut ausgemacht (mittelwertig 43.4 % und 51.2 % gegenüber 21.7 %) (Lai et al., 2021).

1.2.5 PD-1: Das Zielmolekül für Immuncheckpointtherapie

Programmed cell death protein 1 (PD-1) ist ein Transmembranprotein, welches meistens auf Immunzellen, z.B. B- oder T-Zellen, exprimiert wird (Arasanz et al., 2017). PD-1 ist ein Schlüsselfaktor im Rahmen der Immunsystemregulierung. Die Bindung von PD-1 und PD-L1, welches in geringen Mengen in Immun-, Endothel oder Epithelzellen und besonders häufig in neoplastischen Zellen exprimiert wird, formt einen Immuncheckpoint (Schneider et al., 2018). Die Interaktion von PD-L1 und seinem Rezeptor PD-1 sowie die Induktion von T-Zell-Apoptose verhindert die Aktivierung der T-Zellen.

Zellen zahlreicher maligner Tumore hingegen exprimieren PD-L1, um der Immunüberwachung zu entgehen. Durch die Bindung an den PD-1-Rezeptor auf T-Zellen hemmt PD-L1 deren Aktivierung und kann die Apoptose tumorreaktiver T-Zellen fördern, was letztlich das Tumorwachstum begünstigt (Han et al., 2020). Binden Antikörper an PD-1 oder PD-L1 resultiert dies in einer verbesserten anti-tumor Immunität und einer verlängerten Überlebensrate (Dong et al., 2002; Freeman et al., 2000). TRM-Zellen exprimieren neben CD8 und CD103 auch PDL-1. Laut wissenschaftlicher Literatur sind TRM-Zellen nicht nur entscheidend für die Abwehr von Infektionen, sondern auch für die Bekämpfung von Krebs. Tatsächlich wurden Zellen mit einem ähnlichen TRM-Phänotyp in verschiedenen Tumorarten beobachtet (Kumar et al., 2017 und Molodtsov und Turk, 2018).

1.3 Fragestellung der Arbeit

Das Zusammenspiel von Tumor und Tumormikroenvironment sowie insbesondere der Immunzellen spielt eine wichtige Rolle in der Tumorgenese und kann die Tumorthherapie stark beeinflussen. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs zeigen zumeist ein

dichtes Immunzellinfiltrat. Die Infiltrationsdichte bestimmter Subzellen soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Dabei wird die Infiltrationsdichte von CD8⁺, CD103⁺, CD69⁺ und PD-1⁺ in HNSCC mittels QuPath bestimmt und mit klinisch-pathologischen Daten korreliert.

Ziel ist zu evaluieren, ob die Infiltrationsdichte von CD8⁺, CD103⁺, CD69⁺ oder PD-1⁺ Zellen als Marker für gewebständige T-Gedächtniszellen in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Tumorproben

Für die Studie wurde auf Gewebe in Form von Tumor, welches in Paraffinblöcken eingebettet ist, zurückgegriffen. Das Gewebe wurde im Zeitraum von 2011 bis 2014 an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie und der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Bonn entnommen. Voraussetzung stellt eine Diagnose in Form eines vorliegenden Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle (Alveolarkamm, Gingiva, harter Gaumen, Mundboden, Mucosa vestibularis, Zunge), des Oropharynx (weicher Gaumen, Tonsillen, Zungengrund) sowie des Larynx dar.

Ein Votum des Ethikkomitees der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn ist vorhanden (#148/11; #233/20).

2.1.2 Geräte

Tab. 1: verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Leica Aperio XT	Leica, Wetzlar, Deutschland

2.1.3 Software

Tab. 2: verwendete Softwares

Software	Hersteller
QuPath	The Queen's University of Belfast, Northern Ireland
MS Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA

SPSS	Stanford Universität, USA
------	---------------------------

2.2 Methoden

2.2.1 Tissue-Microarrays (TMAs) und immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie wird zur Analyse und Visualisierung von Antigenen durch eine Antigen-Antikörper Reaktion gekoppelt mit einer Farbbildung in unterschiedlichen Geweben oder Zellen angewandt (Taubе et al., 2020). Die verwendeten immunhistochemischen Färbungen wurden auf 2-3 µm dicke Tissue-Microarrays (TMAs) der Bonner HNSCC Kohorte durchgeführt. Dafür wurden Färbeautomaten (Leica, Ventana, MEDAC) verwendet. Mithilfe des Leica Aperio XT Scanners wurden die gefärbten Gewebeschnitte der TMAs hochauflösend digitalisiert.

Tab. 3: primäre Antikörper für Immunfärbungen

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
CD8	Agilent M7103, Clone C8/1448	1:50
CD69	Abcam ab233396, EPR21814	1:100
CD103	Abcam ab129202, EPR4166	1:50
PD-1	Abcam ab52587, NAT105	1:200

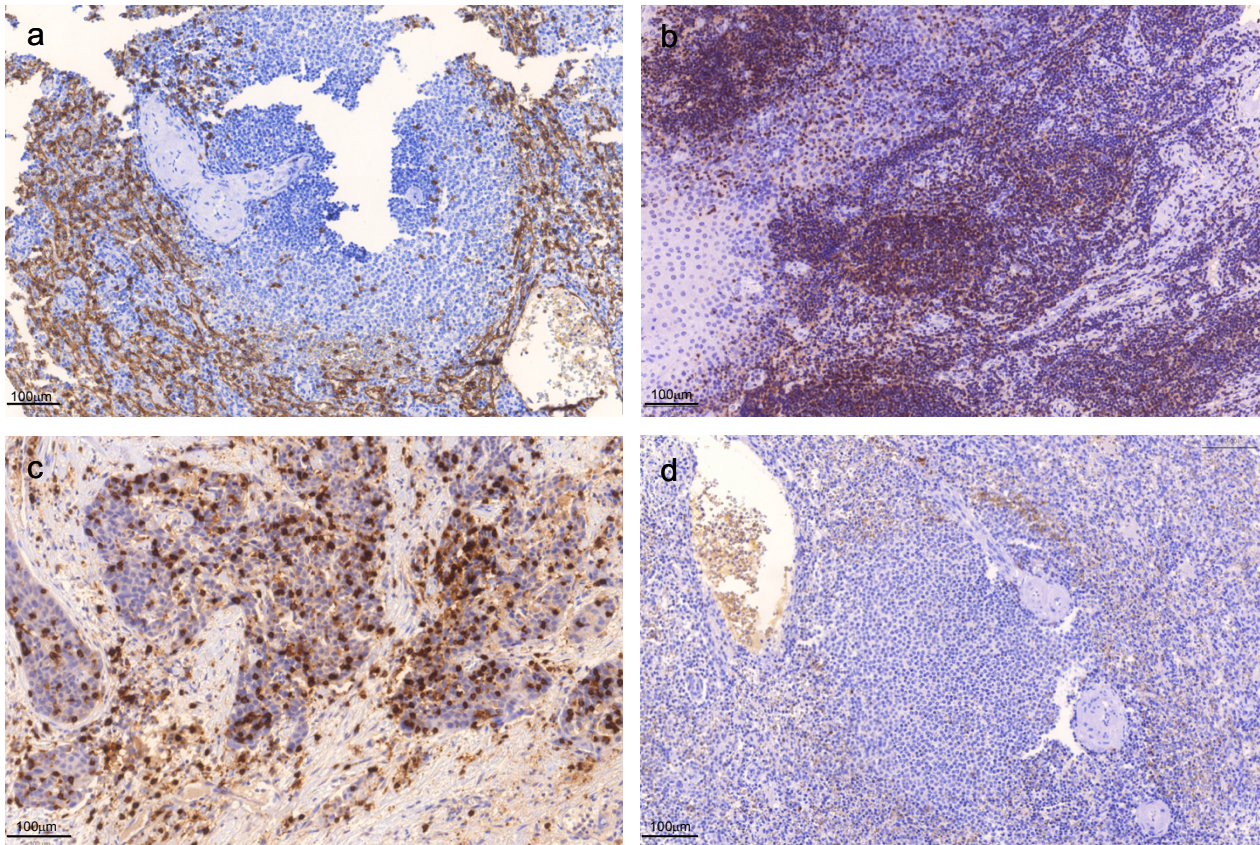


Abb. 5: Beispielbilder der immunhistochemischen Färbung. (a-d) Bonner HNO-Kohorte: (a) CD8, (b) CD69, (c) CD103, (d) PD-1

2.2.2 Auswertung der Daten

2.2.2.1 QuPath Software

QuPath ist eine open source Software zur semiquantitativen Analyse von immunhistochemischen Färbungen. Zur Auswertung wurde die Version 0.4.3 verwendet. Sie ermöglicht die absolute und relative Anzahl an positiven Zellen sowie eine Färbeintensität (H-Score) zu ermitteln. Dieser errechnet sich aus dem Produkt aus verschiedenen Prozentsätzen von Färbeintensitätsstufen und den jeweiligen Intensitätsstufen (Fedchenko und Reifensrath, 2014). Hervorgerufen durch die Objektivität des Analyseprogramms, liefert QuPath eine gute Reproduzierbarkeit und Reliabilität (Bankhead et al., 2017). Eine Liste mit den Einstellungen von QuPath für die verschiedenen immunhistochemischen Färbungen befindet sich im Anhang.

Die Daten wurden in einer Excel File exportiert (Microsoft Office, 2021) und die Mittelwerte der Infiltrationsdichte in $\text{pro mm}^2/\text{Fall}$ wurden ausgerechnet und für die weiteren statistischen Analysen verwendet.

2.2.2.2 Statistik mittels SPSS

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Statistikprogramm IBM SPSS Statistics Version 27 (IBM, Armonk, NY).

Die Untersuchung der Unterschiede zwischen den einzelnen Parametern wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Test und dem Kruskal-Wallis-H-Test durchgeführt. Die ermittelten Ergebnisse bezüglich der Überlebenszeiten der untersuchten Patienten wurden durch den Log-Rank-Test und die Kaplan-Meier-Schätzer dargestellt. Das Gesamtüberleben der Patienten wurde als Zeit zwischen Erstdiagnose und Versterben definiert bzw. letzter klinischer Nachuntersuchung. Alle statistischen Signifikanzen wurden bei p-Werten $< 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkohorte

Die analysierte Kohorte umfasst 125 Patienten mit HNSCC und einem durchschnittlichen Diagnosealter von 66,3 Jahren (Tab. 4). Die Mehrheit der erkrankten Patienten war männlich (80,5 %), wobei der Tumor am häufigsten im Pharynx lokalisiert war (59,6 %), gefolgt vom Larynx (31,7 %). In den Fällen mit verfügbaren klinischen Daten waren 88,7 % Nichtraucher und 79,6 % gaben geringen oder keinen Alkoholkonsum an. Der HPV-Status war in 25,6 % der Fälle positiv. Die häufigsten Tumorstadien bei Erstdiagnose waren T2 (36,3 %) und T3 (24,8 %), zudem zeigten 61,2 % einen Lymphknotenbefall (N1–N3). Die Mehrheit der Tumoren war mäßig differenziert (G2, 61,2 %). Lokalrezidive traten bei 11,5 % und Fernmetastasen bei nur 1,6 % der Patienten auf.

Tab. 4: klinisch-pathologische Daten der HNSCC Kohorte (TMA)

	Anzahl	Prozent (%)
Anzahl	n= 125	
Alter bei Diagnose (Jahre)	Mittelwert: 66.33	
Geschlecht		
männlich	99	80,5
weiblich	24	19,5
ungewiss	12	
Tumorlokalisation		
Mundhöhle	9	8,7
Pharynx	62	59,6
Larynx	33	31,7
ungewiss	21	

Tab. 4: klinisch-pathologische Daten der HNSCC Kohorte (TMA)

Raucherhistorie		
Nichtraucher	47	88,7
Raucher	6	11,3
ungewiss	72	
Alkoholkonsum		
nichts bis wenig	39	79,6
viel	10	20,4
ungewiss	76	76
HPV-Status/ p16		
negativ	87	74,4
positiv	30	25,6
ungewiss	8	
T-Stadium bei Erstdiagnose		
T1	23	20,4
T2	41	36,3
T3	28	24,8
T4	18	15,9
ungewiss	12	
N-Stadium bei Erstdiagnose		
N0	42	42,4
N1/2/3	57	61,2

Tab. 4: klinisch-pathologische Daten der HNSCC Kohorte (TMA)

ungewiss	9	
Grad		
G1	5	4,3
G2	71	61,2
G3	40	34,5
ungewiss	9	
Lokalrezidive		
keine Rezidive	100	88,5
Lokalrezidiv	13	11,5
ungewiss	12	
Fernmetastasen		
Keine Fernmetastasen	69	97,2
Metastasen	2	1,6
ungewiss	54	

Aus technischen Gründen (unterschiedliche Stanzenlänge, Fragmentierung, usw.) wurden unterschiedlich viele Cores/Färbung ausgewertet (Tab. 5). Die Anzahl der CD8-positiven T-Zellen konnte bei 125 Patientenproben, der CD69-positiven Zellen bei 65 Patienten, der CD103-positiven Lymphozyten bei 122 Patienten und der PD-1 positiven Zellen bei 109 Patienten ausgewertet werden. Die Werte mit einem Histogramm betrachtet zeigen eine rechtsschiefe Verteilung.

Tab. 5: Übersicht der Antikörper-Färbungen mit Werten

	CD8/ mm ²	CD69/mm ²	CD103/mm ²	PD-1/mm ²
Anzahl der Fälle	125	65	122	109
Mittelwert	168,37	65,41	189,69	15,00
Median	65,86	17,94	88,91	3,60
Percentile 25	21,25	5,93	30,70	1,32
Percentile 50	65,86	17,94	88,91	3,60
Percentile 75	179,4	46,55	227,69	12,09

Insgesamt besteht die untersuchte Kohorte aus 125 Patienten. Dabei wurden die Ergebnisse, abhängig von den jeweiligen Immunfärbungen, weitergehend hinsichtlich unterschiedlicher Parameter untersucht. Dazu zählen Geschlecht, Lokalisation des Karzinoms, Risikofaktoren, wie z.B. Rauchen, Alkohol und HPV-Infektionen sowie das pT Stadium, pN-Stadium, M Stadium, das Vorhandensein von lokalen Rezidiven und das Grading des Tumors. Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Tabelle 6 ersichtlich.

Tab. 6: Infiltrationsdichte von CD8⁺, CD69⁺, CD103⁺ oder PD-1⁺ Zellen in Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten in einer allgemeinen HNSCC-Kohorte

	CD8 (cell/mm ²)	p-Wert	CD69 (cell/mm ²)	p-Wert	CD103 (cell/mm ²)	p-Wert	PD-1 (cell/mm ²)	p-Wert
n= 125								
Geschlecht								
Männlich	182,19	0,212 ⁽¹⁾	49,32	0,514 ⁽¹⁾	203,32	0,577 ⁽¹⁾	19,89	0,344 ⁽¹⁾
Weiblich	199,17		79,65		330,96		8,18	

Tab. 6: Infiltrationsdichte von CD8⁺, CD69⁺, CD103⁺ oder PD-1⁺ Zellen in Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten in einer allgemeinen HNSCC-Kohorte

Lokalisation								
Mundhöhle	78,26	0,645 ⁽²⁾	29,14	0,149 ⁽²⁾	123,08	0,148 ⁽²⁾	14,34	0,474 ⁽²⁾
Oropharynx	262,77		80,85		285,14		22,90	
Hypopharynx	45,93		17,62		206,36		7,52	
Larynx	133,20		30,12		182,57		12,93	
Rauchen								
Nicht-Raucher	394,37	0,604 ⁽¹⁾	75,93	0,285 ⁽¹⁾	464,07	0,027 ⁽¹⁾	15,10	0,339 ⁽¹⁾
Raucher	231,97		59,21		291,02		13,96	
Alkohol								
Kein Alkohol/ gelegentlich	246,89	0,951 ⁽¹⁾	63,17	0,578 ⁽¹⁾	329,00	0,577 ⁽¹⁾	12,45	0,760 ⁽¹⁾
Viel Alkohol	172,07		35,86		99,22		11,00	
HPV Status/ p16								
negative	219,10	0,140 ⁽¹⁾	58,99	0,889 ⁽¹⁾	223,55	0,844 ⁽¹⁾	17,97	0,598 ⁽¹⁾
positive	143,42		62,35		284,62		9,05	
pT-Stadium								
pT1	264,50	0,637 ⁽²⁾	104,23	0,935 ⁽²⁾	233,27	0,385 ⁽²⁾	15,41	0,917 ⁽²⁾
pT2	225,69		58,53		305,81		14,52	
pT3	78,21		25,83		118,51		18,04	
pT4	148,84		30,80		180,58		34,19	
pN-Stadium								

Tab. 6: Infiltrationsdichte von CD8⁺, CD69⁺, CD103⁺ oder PD-1⁺ Zellen in Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten in einer allgemeinen HNSCC-Kohorte

pN0	228,83	0,062 ⁽¹⁾	44,31	0,521 ⁽¹⁾	127,03	0,026 ⁽¹⁾	6,03	0,112 ⁽¹⁾
pN1/2/3	225,90		97,79		369,67		18,68	
M-Stadium								
M0	Alle M0							
M1								
Lokalrezidiv								
Nein	200,00	0,918 ⁽¹⁾	61,53	0,214 ⁽¹⁾	244,39	0,167 ⁽¹⁾	17,76	0,225 ⁽¹⁾
Ja	116,30		13,55		160,56		23,20	
Grading								
G1	20,72	0,025 ⁽²⁾	10,17	0,024 ⁽²⁾	79,57	0,043 ⁽²⁾	0,00	0,238 ⁽²⁾
G2	146,45		56,92		174,88		18,45	
G3	324,85		64,39		408,07		19,97	
Fernmeta- stasen								
Nein	195,76	0,955 ⁽¹⁾	57,26		239,05	0,937 ⁽¹⁾	18,42	0,014 ⁽¹⁾
Ja	99,55		no		27,17		3,77	

(1) Mann-Whitney test

(2) Kruskal-Wallis test

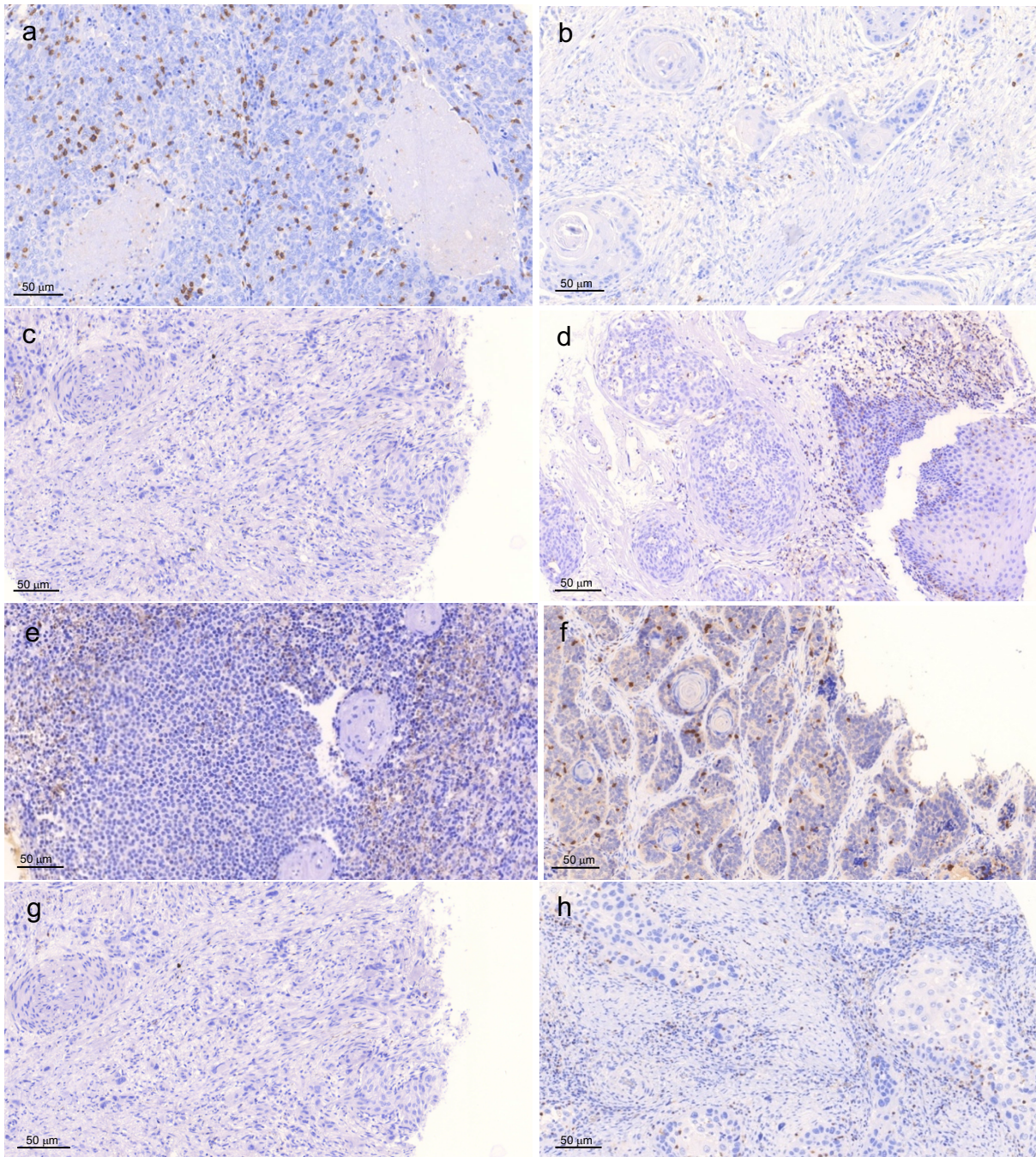


Abb. 6: Unterschiedlich hohe Infiltrationsdichten von CD8+, CD69+, CD103+ oder PD-1+ Zellen: (a) CD8 geringe Infiltrationsdichte, (b) CD8 hohe Infiltrationsdichte, (c) CD69 niedrige Infiltrationsdichte, (d) CD69 hohe Infiltrationsdichte, (e) CD103 niedrige Infiltrationsdichte, (f) CD103 hohe Infiltrationsdichte, (g) PD-1 niedrige Infiltrationsdichte, (h) PD-1 hohe Infiltrationsdichte

3.2 Intratumorale Infiltration der CD8-positiven Lymphozyten

Es konnte kein signifikanter Unterschied bei der Infiltrationsdichte von CD8⁺ Zellen hinsichtlich der Lokalisation des Karzinoms, des Raucherstatus, des Konsums von Alkohol, des HPV-Status, des pT-Stadiums, des pN-Stadiums, des M-Stadiums und dem Vorhandensein von lokalen Rezidiven beobachtet werden. Eine schlechtere Tumordifferenzierung war mit einer höheren Infiltrationsdichte an CD8⁺ Zellen assoziiert (p-Wert = 0,025). Patienten (n= 125) mit einer höheren Infiltrationsdichte an CD8⁺ Zellen zeigten ein besseres Gesamtüberleben (Abb. 7, Log-Rank-Test, p-Wert= 0,04).

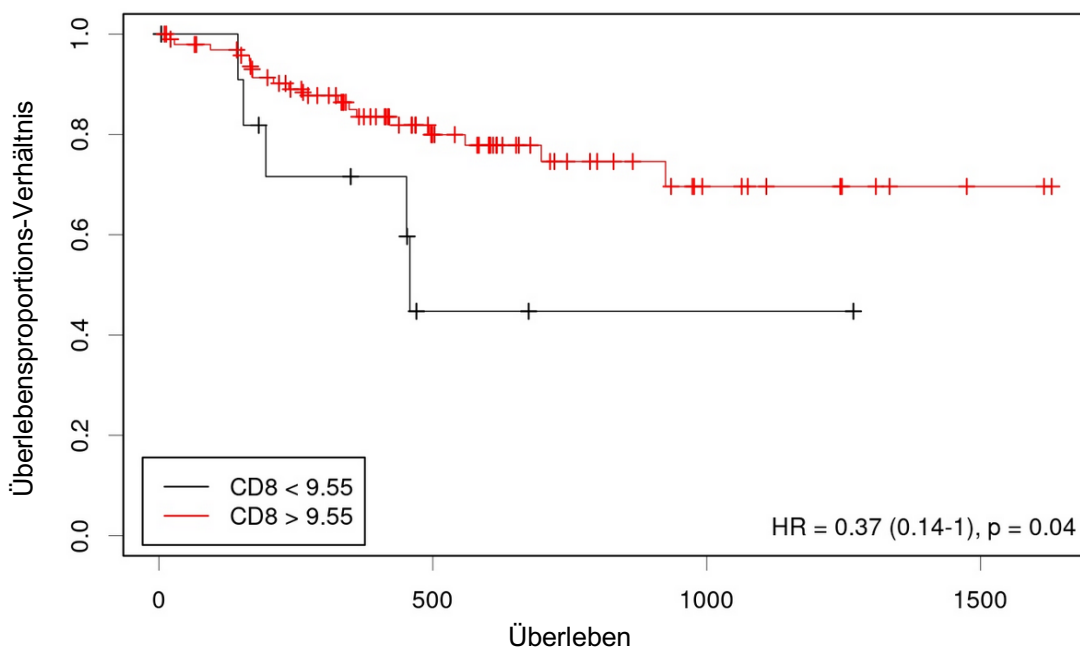


Abb. 7: Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der CD8-Expression in Immunzellen (Log-Rank-Test, p= 0,04)

3.3 Intratumorale Infiltration von CD69-positiven Immunzellen

Die Analyse der Zellinfiltrationsdichte ergab bei männlichen Proben einen durchschnittlichen Wert von 49,32 Zellen/mm² und bei weiblichen Proben 79,65 Zellen/mm². Hinsichtlich der Tumorlokalisation, des Rauchverhaltens, des Alkoholkonsums, des HPV-Status,

des pT-, pN- und M-Stadiums sowie des Auftretens lokaler Rezidive konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Eine schlechtere Tumordifferenzierung bzw. ein höheres Grading war mit einer erhöhten Immunzellinfiltrationsdichte von CD69⁺ Zellen assoziiert (p-Wert= 0,024). In der monovariaten Überlebensanalyse war die Infiltrationsdichte CD69⁺ Zellen kein prognostischer Marker (Abb. 8, Log-Rank-Test, p-Wert= 0,180).

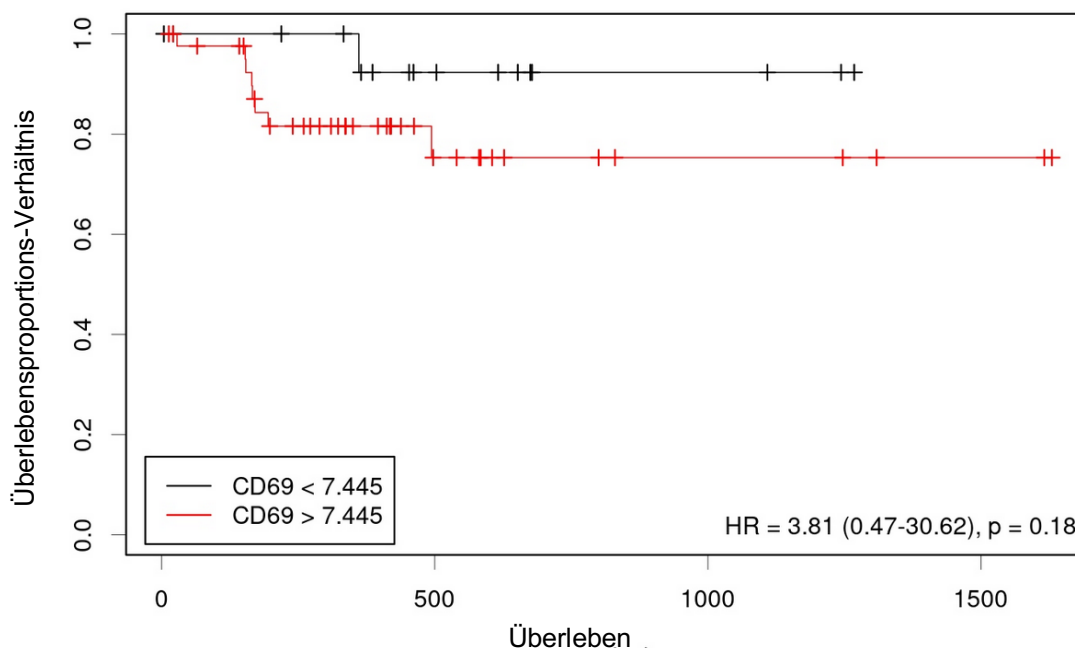


Abb. 8: Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der CD69-Expression in Immunzellen (Log-Rank-Test p= 0,18)

3.4 Intratumorale Infiltration von CD103-positiven Immunzellen

Bei dem männlichen Geschlecht zeigte sich hinsichtlich der Zellinfiltrationsdichte ein Wert von 203,32 Zellen/mm², bei den weiblichen Proben von 330,96 Zellen/mm². Es zeigten sich keine aussagekräftigen Zusammenhänge mit der Tumorlokalisierung, dem Alkoholkonsum, dem HPV-Status, dem pT- oder M-Stadium oder dem Auftreten lokaler Rezidive.

Nicht-Raucher zeigten eine signifikant höhere Infiltrationsdichte an CD103⁺ Zellen als Raucher (Nicht-Rauchern: 464,07 Zellen/mm², Raucher: 291,02 Zellen/mm², p-Wert beträgt 0,027). Patienten mit Lymphknotenmetastasen weisen zudem eine höhere Infiltrationsdichte an CD103⁺ Zellen im Primärtumor auf (pN0: 127,03 Zellen/mm², pN1/2/3: 369,67 Zellen/mm²; p-Wert von 0,026). Schlecht differenzierte Tumore (G3) gehen mit einer erhöhten Immunzellinfiltrationsdichte von CD103⁺ Zellen einher. Eine höhere Infiltrationsdichte an CD103⁺ Zellen war mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben assoziiert (Abb. 9, Log-Rank-Test, p-Wert = 0,011).

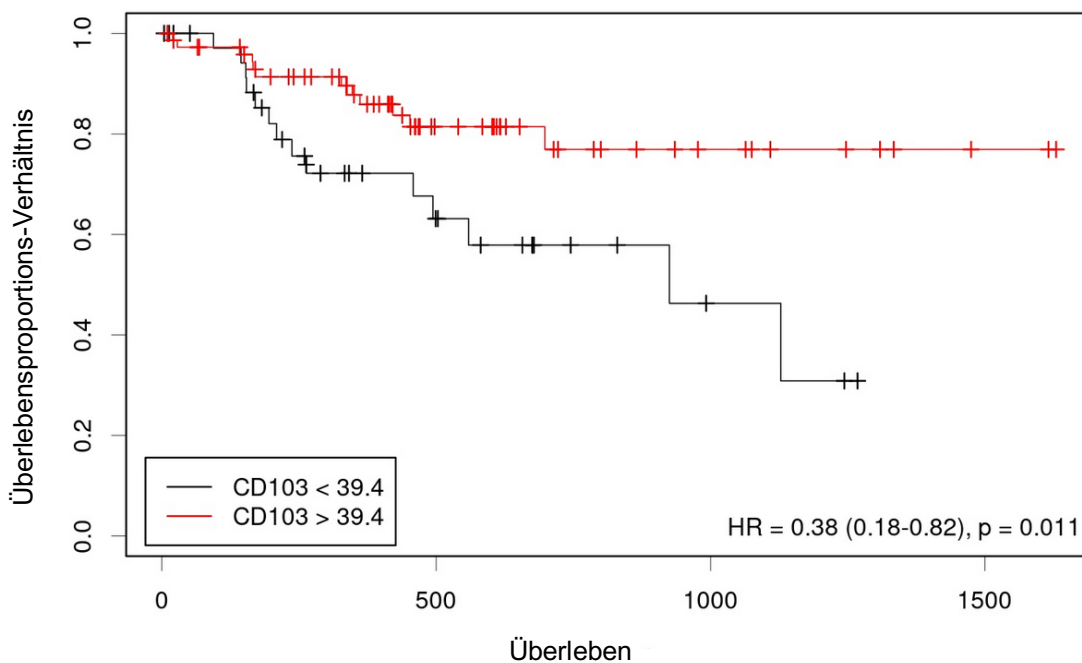


Abb. 9: Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der CD103-Expression in Immunzellen (Log-Rank-Test, p = 0,011)

3.5 PD-1-Expression in intratumoralen Immunzellen

Der durchschnittliche Gesamtwert der untersuchten Proben, die gegen PD-1 gefärbt wurden, ergab 19,89 Zellen/mm² bei Männern und 8,18 Zellen/mm² bei Frauen. Die Lokalisation des Karzinoms, Rauchen, der Konsum von Alkohol, der HPV-Status sowie das pT-, pN-, M-Stadium und Grading zeigten keine signifikanten Auffälligkeiten.

Die dargestellte Kaplan-Meier-Grafik (Abb. 10) zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der PD-1-Expression. Die Überlebenskurve der Gruppe mit niedriger PD-1-Expression (schwarz) verläuft leicht unterhalb der Kurve der Gruppe mit hoher PD-1-Expression (rot). Allerdings zeigt sich keine deutliche Trennung der beiden Kurven und die Unterschiede sind im zeitlichen Verlauf relativ gering. Der Log-Rank-Test ergibt einen p-Wert von 0,062. Der p-Wert deutet auf eine potenzielle, aber nicht eindeutig nachweisbare Abhängigkeit zwischen der PD-1-Expression und der Überlebenswahrscheinlichkeit hin.

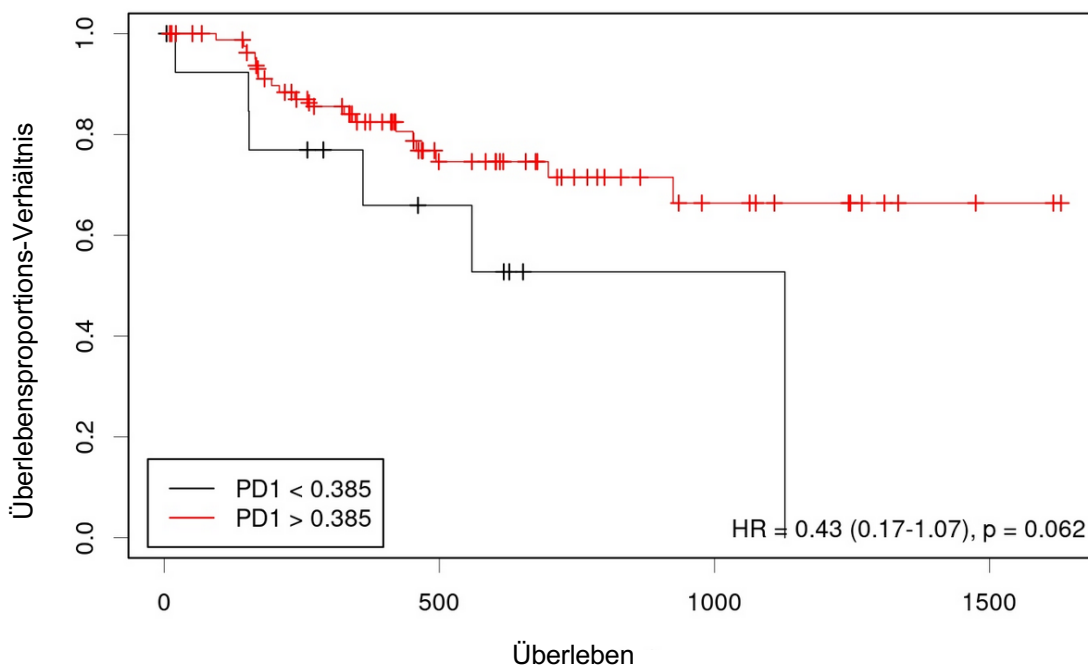


Abb. 10: Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der PD-1-Expression in Immunzellen (Log-Rank-Test, $p = 0,062$)

4. Diskussion

4.1 CD8 Expression in HNSCC

CD8-positive T-Zellen können durch ihre zytotoxische Aktivität gezielt tumorassoziierte Antigene erkennen und eliminieren. Ihre Präsenz im Tumormikromilieu gilt nicht nur als prognostischer Marker, sondern hat auch wachsende Bedeutung für immuntherapeutische Ansätze, insbesondere im Kontext von Checkpoint-Inhibitoren. Ziel der Arbeit war es, die Infiltrationsdichte von CD8⁺-Zellen zu untersuchen und zu prüfen, ob die Anzahl der geweberesidenten T-Gedächtniszellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist.

In der durchgeführten Untersuchung zeigte sich eine mittlere CD8⁺ Zellinfiltrationsdichte von 168,37 Zellen/mm² in der untersuchten Patientenkohorte. Während kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CD8-Infiltration und Parametern wie Geschlecht, Tumorlokalisation, Alkohol- und Nikotinkonsum, HPV-Status oder pT-/pN-Stadium festgestellt wurde, fiel insbesondere beim Tumorgrading ein signifikanter Unterschied auf. Schlecht differenzierte Tumoren (G3) wiesen mit 324,85 Zellen/mm² eine deutlich höhere CD8⁺-Infiltration auf als gut differenzierte Tumoren (G1) mit lediglich 20,72 Zellen/mm² ($p=0,025$). Dieser Befund legt nahe, dass höhergradige Tumore potenziell immunogener sind (höhere Immunzellinfiltrationsdichte) und möglicherweise durch eine höhere Mutationslast oder ein entzündungsförderndes Tumormikromilieu eine stärkere Immunzellrekrutierung induzieren. Diese Beobachtung wird durch weitere bereits publizierte Studien gestützt. Es wurde festgestellt, dass die Infiltration von CD8⁺ T-Zellen in verschiedenen Tumorregionen, insbesondere am invasiven Rand, prognostisch relevant ist (Leddon et al., 2022). Bezüglich der Mutationslast zeigen Daten aus der TCGA-Datenbank, dass HNSCC-Patienten eine hohe Rate an somatischen Mutationen aufweisen, wobei TP53-Mutationen in 66 % der Fälle auftreten. Eine höhere Mutationslast kann zu einer erhöhten Neoantigenbildung führen, was wiederum die Immunogenität des Tumors steigert und eine verstärkte Infiltration von Immunzellen, insbesondere CD8⁺ T-Zellen, begünstigt (Jiang et al., 2021). In anderen Tumorentitäten wurde ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Tumorgrading und CD8⁺ T-Zell-Infiltration beobachtet. In einer Studie zu nicht-kleinzelligem Lungenkarzinomen (NSCLC) wurde festgestellt, dass eine hohe CD8⁺ T-Zell-Infiltration mit einem

verbesserten Gesamtüberleben assoziiert ist, insbesondere bei PD-L1-negativen Tumoren (Schulze et al., 2020).

Ähnliche Ergebnisse konnten auch Hu und Kollegen zeigen: In ihrer retrospektiven Analyse von Patienten mit hypopharyngealem Plattenepithelkarzinom konnte gezeigt werden, dass eine hohe CD8⁺ TIL-Infiltration signifikant mit einem verlängerten Gesamtüberleben ($p=0,005$) und krankheitsfreien Überleben ($p=0,015$) assoziiert war. Darüber hinaus bestätigten sowohl uni- als auch multivariate Analysen die starke prognostische Relevanz der CD8⁺ TILs in dieser Entität (Hu et al., 2020). Besonders hervorzuheben ist zudem der Befund von Hu et al., dass die Kombination einer hohen CD8⁺ TIL-Infiltration mit PD-L1-Positivität eine zusätzliche prognostische Aussagekraft besaß (OS, $p=0,025$). Diese Beobachtung legt nahe, dass nicht nur einzelne Marker, sondern deren Zusammenspiel im Tumormikromilieu entscheidend für das Überleben der Patienten sein könnte. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Lyford-Pike et al., die bei HPV-assoziierten HNSCC eine deutlich erhöhte CD8⁺-Infiltration in schlecht differenzierten Tumoren beobachteten und diese mit einer immunogenen Tumorbilogie in Zusammenhang brachten (Lyford-Pike et al., 2013).

Außerdem zeigt eine Analyse von Shimizu et al. (2019), dass eine hohe Dichte von CD8⁺ T-Zellen im Tumorstroma mit einem verbesserten Gesamtüberleben bei Patienten mit oropharyngealem Plattenepithelkarzinom assoziiert ist.

Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, dass schlecht differenzierte HNSCC-Tumore durch eine höhere Mutationslast und ein entzündungsförderndes Mikromilieu charakterisiert sind, was zu einer verstärkten Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen führt. Dies unterstreicht die Bedeutung der Immunzellinfiltration als prognostischen Marker und potenziellen therapeutischen Angriffspunkt bei HNSCC.

4.2 CD69 Expression in HNSCC

In der vorliegenden Arbeit wurde die Infiltrationsdichte von Zellen mit dem Aktivierungsmarker CD69 in HNSCC immunhistochemisch untersucht. Die Ergebnisse liefern wichtige

Hinweise zur Rolle von CD69⁺ Zellen im Tumormikromilieu, insbesondere im Zusammenhang mit der Tumordifferenzierung, Immunzellinfiltration und Prognose.

Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Assoziation zwischen dem Grading des Tumors und der CD69-positiven Zellinfiltration. Während gut differenzierte Tumoren (G1) eine geringe Infiltrationsdichte von durchschnittlich 10,17 Zellen/mm² aufwiesen, war diese bei G2- und G3-Tumoren mit 56,92 bzw. 64,39 Zellen/mm² deutlich erhöht ($p = 0,024$). Dieses Ergebnis spricht für eine stärkere Immunzellrekrutierung in höhergradig malignen Tumoren, möglicherweise als Folge einer erhöhten immunogenen Aktivität oder Nekrose-induzierter Immunstimulation in aggressiveren Tumorformen. Eine Studie von Badoual et al. aus 2006 hat ähnliche Beobachtungen zur Assoziation zwischen CD69-positiver Immunzellinfiltration und einer besseren Prognose bei HNSCC gemacht. In dieser Studie analysierten die Autoren die Infiltration verschiedener CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen, einschließlich aktivierter CD4⁺CD69⁺ T-Zellen, in Tumorgewebe von Patienten mit HNSCC. Dabei ergab sich, dass eine hohe Infiltration von CD4⁺CD69⁺ T-Zellen signifikant mit einer besseren lokalen Tumorkontrolle ($p = 0,01$) und einem längeren Gesamtüberleben ($p = 0,01$) assoziiert war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD69 als Marker für aktivierte T-Zellen eine prognostische Bedeutung bei HNSCC haben könnte.

Hinsichtlich des Gesamtüberlebens ergab die Kaplan-Meier-Analyse keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben zwischen Patientengruppen mit hoher gegenüber niedriger CD69-Expression (Abb. 6 HR= 3,81; Log-Rank-Test $p = 0,18$). Eine mögliche Ursache, dass in der untersuchten Studie das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der CD69⁺ Zellinfiltration nicht signifikant ist, kann daran begründet sein, dass in der vorliegenden Dissertation keine Lymphozyten-Subtypen (wie CD4⁺CD69⁺ Lymphozyten) analysiert wurden, sondern lediglich die Gesamtanzahl an CD69⁺ Immunzellen.

Die mittlere Dichte CD69-positiver Zellen lag bei 65,41 Zellen/mm² (Median= 17,94), mit einer breiten Spannweite (P25= 5,93; P75= 46,55). Diese starke Streuung könnte auf Heterogenität im Tumormikromilieu, unterschiedliche Aktivierungszustände oder immunologische Kompartimentierung hinweisen. Die vergleichsweise geringe Nachweisbarkeit von

CD69 im Vergleich zu CD8⁺- (Median= 65,86) und CD103⁺-Zellen (Median= 88,91) lässt sich durch seine Funktion als kurzzeitig exprimierter Aktivierungsmarker erklären.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Infiltrationsdichte an CD69⁺ Zellen in Abhängigkeit von Geschlecht, Tumorlokalisation, HPV/p16-Status, Alkohol- oder Tabakkonsum festgestellt werden. Auch das pT- und pN-Stadium sowie das Auftreten lokaler Rezidive hatten keinen signifikanten Einfluss.

Abschließend lässt sich feststellen, dass eine erhöhte CD69-Expression und damit einhergehend eine erhöhte Immunzellinfiltrationsdichte in HNSCC-Tumoren mit einem schlechteren Differenzierungsgrad korreliert. Ein Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Somit scheint CD69 kein verlässlicher prognostischer Biomarker in dieser Entität zu sein, könnte aber als Marker für immunologische Aktivität in schlecht differenzierten Tumoren von Interesse sein. Weitere funktionelle Studien zur Rolle von CD69 im Tumormikromilieu von HNSCC sind erforderlich.

4.3 Die Rolle positiver CD103 Zellen in HNSCC

Die vorliegende Untersuchung belegt eine signifikant erhöhte CD103⁺ Zellinfiltration bei Patienten mit HNSCC in bestimmten klinischen Subgruppen. CD103 spielt eine zentrale Rolle in der lokalen Immunantwort gegen solide Tumoren, indem dieser T-Zellen im epithelialen Tumorgewebe verankert und so eine kontinuierliche Immunüberwachung ermöglicht (Mami-Chouaib et al., 2018). Signifikante Unterschiede zeigten sich im Grading, pN-Stadium und Rauchverhalten. G3-Tumoren wiesen mit 408,07 Zellen/mm² eine signifikant höhere CD103⁺ Zellinfiltration auf als G2- (174,88 Zellen/mm²) und G1-Tumoren (79,57 Zellen/mm²; p= 0,043). Dies könnte auf eine reaktive Immunantwort bei aggressiveren Tumorformen oder ein spezifisches entzündliches Tumormikromilieu hinweisen.

Ebenfalls signifikant war der Unterschied zwischen der Zellinfiltrationsdichte bei Rauchern und Nichtrauchern (291,02 vs. 464,07 Zellen/mm²; p= 0,027). Dies könnte ein Hinweis auf eine durch Rauchen vermittelte Immunsuppression sein. Eine Studie von Ngamphaiboon et al. (2019) untersuchte 203 HNSCC-Patienten und fand heraus, dass eine hohe Dichte von CD8⁺ TILs signifikant mit dem Nichtraucherstatus assoziiert war (p= 0,020). Patienten

mit höherer CD8⁺ TIL-Dichte zeigten zudem eine verbesserte Gesamtüberlebensrate ($p=0,032$). Auch bei HPV-positiven oropharyngealen PEC wird beschrieben, dass diese eine höhere Anzahl an CD103⁺CD8⁺ TRM-Zellen aufweisen als HPV-negative Tumore (Hewavisingi et al., 2020). Somit besteht ein Zusammenhang zwischen der gesteigerten Präsenz und einem verbesserten Gesamtüberleben sowie einem reduzierten Risiko für loko-regionäre Rezidive. Obwohl die Studie den Raucherstatus nicht direkt analysierte, ist bekannt, dass HPV-negative OPSCC häufiger bei Rauchern auftreten, was auf eine mögliche indirekte Assoziation zwischen Rauchen und einer geringeren CD103⁺ TRM-Zellinfiltration hinweist.

Nodalpositive HNSCC Primärtumore wiesen zudem eine signifikant höhere Infiltrationsdichte von CD103⁺ Zellen (369,67 Zellen/mm²) auf als Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (127,03 Zellen/mm²; $p=0,026$), was möglicherweise als Folge einer gesteigerten Immunzellrekrutierung im metastatischen Kontext zurückzuführen ist. In einer retrospektiven Kohorten-Studie analysierten Smith et al. (2022) die Korrelation zwischen TIL-Subtypen und dem PD-L1 CPS bei persistierenden oder rezidivierenden Larynxkarzinomen und stellten fest, dass Patienten mit pathologisch nodal-negativen Tumoren (pN0) und hoher CD103⁺ TIL-Dichte die günstigsten Überlebensraten aufwiesen.

Ali et al. (2020) fanden heraus, dass eine höhere Anzahl von CD103⁺ tumorresidenten CD8⁺ T-Zellen mit einem verbesserten Überleben bei Patienten mit oropharyngealem PEC assoziiert ist. Ähnliche Ergebnisse wurden von Xiao et al. berichtet, die zeigten, dass eine erhöhte Dichte von CD103⁺CD8⁺ TILs mit einem günstigen Überleben bei Patienten mit oralen PEC assoziiert ist (Xiao et al., 2019). In der univariaten Analyse war eine hohe Infiltrationsdichte an CD103⁺ Zellen mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert (Abb. 7, Log-Rank-Test $p=0,011$). Eine systematische Übersichtsarbeit und Meta-Analyse von Kim et al. (2019) evaluierte die prognostische Bedeutung von CD103⁺ Immunzellen in verschiedenen soliden Tumoren, einschließlich HNSCC. Die Analyse von zehn Studien mit insgesamt 2.824 Patienten zeigte, dass eine hohe CD103⁺ Zellinfiltration mit einem verbesserten Gesamtüberleben, krankheitsfreiem Überleben und krankheitsspezifischem Überleben assoziiert ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Verwendung von CD103 als prognostischen Biomarker.

Diese Beobachtung wird gestützt durch mehrere Studien, die CD103⁺ TRM-Zellen als positiven prognostischen Marker identifiziert haben. Duhen et al. (2018) beschrieben, dass CD103⁺CD8⁺ TRM-Zellen eine hohe Tumorreaktivität und Zytotoxizität aufweisen und mit verlängertem Überleben in soliden Tumoren assoziiert sind (HR < 1). Darüber hinaus zeigten sich in HNSCC erhöhte Frequenzen von CD103⁺CD39⁺ CD8⁺ TILs mit einem verbesserten Gesamtüberleben. Diese Zellen charakterisiert eine tumorreaktive Signatur sowie eine effektive zytotoxische Aktivität gegenüber autologen Tumorzellen (Duhen et al, 2018). Auch Ida et al. (2021) beschreiben einen Zusammenhang zwischen TRM-Zellen (CD103⁺CD8⁺), einem entzündlichen Tumormikromilieu und einem verlängerten Gesamtüberleben von Patienten mit HNSCC. In anderen Tumorentitäten wie dem Magenkarzinom wurde gezeigt, dass die Präsenz von CXCL13⁺CD103⁺CD8⁺ TRM-Zellen in Tumorgewebe mit einer besseren Reaktion auf Anti-PD-1-Therapie korreliert, da diese die Antitumorimmunität durch die Sekretion von CXCL13 und Granzyme B fördern (Hu et al., 2024).

Die CD103⁺-Expression zeigt nicht nur eine Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern wie Grading und pN-Stadium, sondern erweist sich in der Überlebensanalyse auch als prognostischer Marker. Dies stärkt die Hypothese, dass CD103⁺ TRM-Zellen eine essenzielle Rolle in der Tumorabwehr bei HNSCC spielen und als potenzielle Zielstruktur für immunmodulatorische Therapien in Frage kommen.

4.4 PD-1 Expression auf den Immunzellen in HNSCC

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von PD-1 auf tumorinfiltrierende Immunzellen bei Patienten mit HNSCC untersucht. Es konnten keine signifikanten Assoziationen der PD-1-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern wie Tumoralokalisation, Tabak- oder Alkoholkonsum, HPV-Status, pT-, pN- und M-Stadium sowie dem histologischen Grading festgestellt werden.

Bei anderen Tumorentitäten, z.B. dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen wurde in einer Studie mit 474 Patienten festgestellt, dass eine hohe PD-1-Expression (≥10 %) auf TILs signifikant mit einem höheren Tumorigrad (G3) assoziiert ist. Zudem war eine

hohe PD-1-Expression ein unabhängiger negativer Prognosefaktor für das 10-Jahres-Überleben (Hazard Ratio: 1,328; $p = 0,009$) (Dan et al., 2024).

In der univariaten Überlebensanalyse war die Infiltrationsdichte der PD-1 Zellen in der HNSCC-Kohorte kein prognostischer Marker, allerdings konnte eine Tendenz beobachtet werden, dass eine höhere Infiltrationsdichte von PD-1 Zellen eher bei Patienten mit besserem Gesamtüberleben auftritt (Hazard Ratio 0,43; Log-Rank-Test p -Wert von 0,062). Die hier beschriebenen Ergebnisse stehen im Einklang mit mehreren Studien, die eine positive Assoziation zwischen PD-1-Expression auf TILs und einem verbesserten Überleben bei HNSCC Patienten nahelegen. Schneider et al. (2018) untersuchten PD-1-positive TILs in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen und konnten eine signifikant verlängerte Gesamt- und krankheitsfreie Überlebenszeit bei hoher PD-1-Expression insbesondere bei Oropharynx- und Hypopharynxkarzinomen nachweisen (jeweils $p = 0,001$). Auch in der HPV-negativen Subgruppe zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,005$ bzw. $p = 0,001$). In der multivariaten Analyse wurde PD-1 als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert.

Darüber hinaus gibt es viele Untersuchungen zu dem Bindungskomplex zwischen PD-1 und PD-L1 bei HNSCC. De Vincente et al. (2019) untersuchten die PD-1 und PD-L1 Expression hinsichtlich des Gesamtüberlebens in oralen Plattenepithelkarzinomen. Eine PD-L1-Expression in mehr als 10 % der Tumorzellen war mit einem schlechteren Überleben assoziiert und wurde als klinisch relevanter Schwellenwert etabliert. Diese relevante PD-L1-Expression konnte – abhängig vom verwendeten Anti-PD-L1-Antikörper – in 10 % bis 15 % der oralen Plattenepithelkarzinomproben nachgewiesen werden und zeigte eine inverse Korrelation mit Tabak- und Alkoholkonsum. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen ergab sich ein Zusammenhang zwischen PD-L1-Expression, Tumorrezidiven und einer geringeren krankheitsspezifischen Überlebensrate. In der multivariaten Analyse wurden sowohl zervikale Lymphknotenmetastasen (Hazard Ratio 2,304; $p = 0,009$) als auch die Tumor-PD-L1-Expression (Hazard Ratio 2,571; $p = 0,01$) als signifikante, unabhängige Prognosefaktoren für ein ungünstiges Outcome identifiziert. Auch hinsichtlich des Nodalstatus zeigt eine Studie, dass die PD-L1-Expression signifikant mit Lymphknotenmetastasen korreliert. Chen et al. (2019b) berichteten über eine positive Korrelation zwischen der PD-1-/PD-L1-Expression und dem Gesamtüberleben. In ihrer Kohorte zeigte

sich insbesondere bei Patienten mit HPV-positiven Tumoren und hoher PD-L1-Expression ein signifikant verbessertes Überleben ($p = 0,001$). Hier wurde PD-L1 in der multivariaten Analyse als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt. Eine aktuelle Meta-Analyse von Huang et al. (2021) fasste mehrere Studien zur PD-L1-Expression unter anti-PD-1/PD-L1-Therapie zusammen und konnte zeigen, dass Patienten mit hoher PD-L1-Expression signifikant höhere Überlebensraten nach 6 und 12 Monaten aufwiesen ($RR = 1,30$; $p = 0,03$ bzw. $RR = 1,31$; $p = 0,01$). Zudem war die objektive Ansprechrates in dieser Gruppe deutlich erhöht.

Auch zeigte sich bei der Untersuchung der immunhistochemisch angefärbten Patientenproben, dass die PD-1-Expression bei HNSCC Patienten signifikant höher ist, wenn keine Fernmetastasen vorliegen, im Vergleich zu Patienten mit Fernmetastasen (18,42 vs. 3,77; $p = 0,014$). Dies deutet darauf hin, dass eine ausgeprägte PD-1 Expression mit einer aktiveren, tumorgerichteten Immunantwort assoziiert sein könnte, die sich hemmend auf Metastasen auswirkt. Eine Untersuchung von Qiao et al. (2020) zeigt, dass die Rolle von PD-1/PD-L1 in Bezug auf Fernmetastasen bei HNSCC komplex ist. Während einige Studien eine Assoziation mit Tumorprogression und Metastasierung zeigen, deuten andere, insbesondere bei HPV-positiven Tumoren, auf protektive Effekte und bessere Therapieansprechen hin.

Diese Befunde legen nahe, dass eine erhöhte PD-1- oder PD-L1-Expression mit einer aktiven anti-tumoralen Immunantwort assoziiert ist. Die Expression von PD-1 kann als Marker einer präexistenten, jedoch möglicherweise erschöpften T-Zell-Antwort interpretiert werden. Dies erklärt möglicherweise auch das bessere Ansprechen dieser Patienten auf Immuncheckpoint-Inhibitoren. Insgesamt deuten die vorliegenden Ergebnisse auf eine tendenziell bessere Prognose bei HNSCC Patienten mit erhöhter PD-1-Expression hin. Trotz fehlender statistischer Signifikanz in der eigenen Kohorte liefern die Resultate wichtige Hinweise auf eine mögliche immunologische Relevanz und präsentieren konsistente Ergebnisse mit aktuellen Studien, welche PD-1 als prognostischen und möglichen prädiktiven Biomarker identifizieren. Dennoch unterstreichen die Befunde die Notwendigkeit weiterführender Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven sowie funktionellen Analysen, um die Rolle von PD-1 in der Tumorimmunologie bei HNSCC präziser einordnen zu können.

5. Zusammenfassung

Tumorassoziierte Lymphozyten sind ein wichtiger Faktor im Tumormikroenvironment in verschiedenen Tumorentitäten. In dieser Arbeit wurde die Infiltrationsdichte an CD8⁺, CD69⁺, CD103⁺ und PD-1⁺ Zellen in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches untersucht.

Nodalpositive Plattenepithelkarzinome wiesen eine signifikant höhere Infiltrationsdichte mit CD103⁺ Zellen auf. Die Infiltration mit CD8⁺, CD69⁺ und CD103⁺ Zellen war in höhergradigen Tumoren (G3) signifikant erhöht. Nichtraucher zeigten eine signifikant höhere CD103⁺ Zellzahl als Raucher. Bei der PD-1-Expression wiesen Männer eine höhere Expression auf als Frauen. Signifikante Unterschiede der Infiltrationsdichte ließen sich bei Tumorstadium, Humanen Papillomviren oder Alkoholkonsum nicht beobachten.

Eine höhere Infiltrationsdichte mit CD8⁺ oder CD103⁺ Zellen war mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert, eine ähnliche Tendenz ließ sich auch für CD69⁺ Zellen beobachten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass insbesondere CD103⁺ und PD-1⁺ Immunzellen potenziell prognostische Relevanz bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches besitzen könnten. Die erhobenen Daten legen nahe, dass die Immunzellinfiltration in Abhängigkeit von Tumorgrad, metastasiertem Lymphknoten-Stadium und Raucherstatus variiert und wichtige Rückschlüsse auf das Tumormikromilieu und die Immunantwort erlaubt. Während CD69⁺ Zellen eher die immunologische Aktivität widerspiegeln, könnte PD-1 als Hinweis auf ein funktionell erschöpftes, aber therapeutisch adressierbares Immunsystem interpretiert werden. Diese Erkenntnisse betonen die Bedeutung des Tumormikromilieus für die Prognose und mögliche therapeutische Ansätze bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Beispiel einer homogenen Leukoplakie der Wangenschleimhaut (Kreppel, 2011)	12
Abb. 2: Beispiel einer Erythroplakie an der Zunge (Mundschleimhautsprechstunde der zahnärztlichen Oralchirurgie des Universitätsklinikums Bonn, 2024)	13
Abb. 3: Beispiel eines oralen Lichen planus im Vestibulum (Mundschleimhautsprechstunde der zahnärztlichen Oralchirurgie des Universitätsklinikums Bonn, 2024)	14
Abb. 4: ICI und dessen Funktionsweise (National Cancer Institute, 2015).....	18
Abb. 5: Beispielbilder der immunhistochemischen Färbung. (a-d) Bonner HNO-Kohorte: (a) CD8, (b) CD69, (c) CD103, (d) PD-1	29
Abb. 6: Unterschiedlich hohe Infiltrationsdichten von CD8+, CD69+, CD103+ oder PD-1+ Zellen: (a) CD8 geringe Infiltrationsdichte, (b) CD8 hohe Infiltrationsdichte, (c) CD69 niedrige Infiltrationsdichte, (d) CD69 hohe Infiltrationsdichte, (e) CD103 niedrige Infiltrationsdichte, (f) CD103 hohe Infiltrationsdichte, (g) PD-1 niedrige Infiltrationsdichte, (h) PD-1 hohe Infiltrationsdichte	37
Abb. 7: Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der CD8-Expression in Immunzellen (Log-Rank-Test, $p = 0,04$)	38
Abb. 8: Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der CD69-Expression in Immunzellen (Log-Rank-Test $p = 0,18$).....	39
Abb. 9: Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der CD103-Expression in Immunzellen (Log-Rank-Test, $p = 0,011$).....	40

Abb. 10: Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der PD-1-Expression in Immunzellen (Log-Rank-Test, $p = 0,062$).....	41
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: verwendete Geräte.....	27
Tab. 2: verwendete Softwares.....	27
Tab. 3: primäre Antikörper für Immunfärbungen	28
Tab. 4: klinisch-pathologische Daten der HNSCC Kohorte (TMA).....	31
Tab. 5: Übersicht der Antikörper-Färbungen mit Werten.....	34
Tab. 6: Infiltrationsdichte von CD8 ⁺ , CD69 ⁺ , CD103 ⁺ oder PD-1 ⁺ Zellen in Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten in einer allgemeinen HNSCC-Kohorte.....	34

8. Literaturverzeichnis

8.1 Literatur

Abati S, Bramati C, Bondi S, Lissoni A, Trimarchi M. Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17: 9160.

Ali A, Bari MF, Arshad S, Wahid M, Safdar J, Anwar K, et al. Tissue-resident memory T-cell expressions and their prognostic role in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2025; 25: 356.

Almangush A, De Keukeleire S, Rottey S, Ferdinande L, Vermassen T, Leivo I, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Cancer: Ready for Prime Time? *Cancers (Basel)* 2022; 14: 1558.

Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea M, Breckpot K, Kochan G, et al. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget* 2017; 8: 51936–51945.

Aricó M, Burgio GR. Mononuclear cell derangement. *Pediatr Hematol Oncol* 1989; 6: 277–282.

Azizzadeh B, Yafai S, Rawnsley JD, Abemayor E, Sercarz JA, Calcaterra TC, et al. Radial forearm free flap pharyngoesophageal reconstruction. *Laryngoscope* 2001; 111: 807–810.

Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res* 2013; 73: 128–138.

Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay NEH, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 465–472.

Bailey AP, Streit A. Sensory organs: making and breaking the pre-placodal region. *Curr Top Dev Biol* 2006; 72: 167–204.

Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017; 7: 16878.

Bewley AF, Farwell DG. Oral leukoplakia and oral cavity squamous cell carcinoma. *Clin Dermatol* 2017; 35: 461–467.

Bosetti C, Gallus S, Trichopoulou A, Talamini R, Franceschi S, Negri E, et al. Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 1091–1094.

Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, 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: 1915–1928.

Castelli ML, Pecorari G, Succo G, Bena A, Andreis M, Sartoris A. Pectoralis major myocutaneous flap: analysis of complications in difficult patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258: 542–545.

Chamoli A, Gosavi AS, Shirwadkar UP, Wangdale KV, Behera SK, Kurrey NK, et al. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. *Oral Oncol* 2021; 121: 105451.

Chan JYK, Lua LL, Starmer HH, Sun DQ, Rosenblatt ES, Gourin CG. The relationship between depressive symptoms and initial quality of life and function in head and neck cancer. *Laryngoscope* 2011; 121: 1212–1218.

Chen Q, Fu Y-Y, Yue Q-N, Wu Q, Tang Y, Wang W-Y, et al. Distribution of PD-L1 expression and its relationship with clinicopathological variables: an audit from 1071 cases of surgically resected non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2019; 12: 774–786.

Chen S-W, Li S-H, Shi D-B, Jiang W-M, Song M, Yang A-K, et al. Expression of PD-1/PD-L1 in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Int J Biol Markers* 2019; 34: 398–405.

Chiesa F. Centenary of Crile's operation. From radical to selective neck dissection. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2006; 26: 307–308.

Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol* 2017; 47: 946–953.

Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn M-J, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019; 393: 156–167.

Coordes A, Lenarz M, Kaufmann AM, Albers AE. [Role of miRNA in malignoma of the head and neck]. *Laryngorhinootologie* 2014; 93: 201–209; quiz 210.

Corgnac S, Malenica I, Mezquita L, Auclin E, Voilin E, Kacher J, et al. CD103+CD8+ TRM Cells Accumulate in Tumors of Anti-PD-1-Responder Lung Cancer Patients and Are Tumor-Reactive Lymphocytes Enriched with Tc17. *Cell Rep Med* 2020; 1: 100127.

Dan A, Aricak O, Rounis K, Montero-Fernandez MA, Guijarro R, Ekman S, et al. PD-1 expression in tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer. *Front Oncol* 2024; 14: 1414900.

Dasgupta S, Chakrabarti S, Deb AR. Tumor infiltrating lymphocytes in head and neck squamous cell carcinoma - Evaluation and clinical impact. *J Cancer Res Ther* 2022; 18: 49–54.

Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho C-H, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol* 2010; 2: 15.

D'Cruz AK, Vaish R, Kapre N, Dandekar M, Gupta S, Hawaldar R, et al. Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 521–529.

Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8: 793–800.

Du E, Mazul AL, Farquhar D, Brennan P, Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, et al. Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *Laryngoscope* 2019; 129: 2506–2513.

Duhen T, Duhen R, Montler R, Moses J, Moudgil T, de Miranda NF, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat Commun* 2018; 9: 2724.

Eisen D, Carrozzo M, Bagan Sebastian J-V, Thongprasom K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis* 2005; 11: 338–349.

Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol* 2014; 9: 221.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; 144: 1941–1953.

Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra 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: 45–51.

Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2016; 375: 1856–1867.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, 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: 1027–1034.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960–1964.

Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M, Broccoletti R, Carbone M, Pagano M, et al. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol* 2004; 40: 77–83.

Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Dahlgren LO, Joneberg J, et al. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2006; 119: 2620–2623.

Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 2020; 10: 727–742.

Harrington KJ, Ferris RL, Gillison M, Tahara M, Argiris A, Fayette J, et al. Efficacy and Safety of Nivolumab Plus Ipilimumab vs Nivolumab Alone for Treatment of Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: The Phase 2 CheckMate 714 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2023; 9: 779–789.

Hayes RB, Bravo-Otero E, Kleinman DV, Brown LM, Fraumeni JF, Harty LC, et al. Tobacco and alcohol use and oral cancer in Puerto Rico. *Cancer Causes Control* 1999; 10: 27–33.

Hewavisenti R, Ferguson A, Wang K, Jones D, Gebhardt T, Edwards J, et al. CD103+ tumor-resident CD8+ T cell numbers underlie improved patient survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Immunother Cancer* 2020; 8: e000452.

Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann KF, McDermott DF, et al. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 1558–1568.

Hoffmann JC, Schön MP. Integrin $\alpha E(CD103)\beta 7$ in Epithelial Cancer. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 6211.

Holmstrup P. Oral erythroplakia-What is it? *Oral Dis* 2018; 24: 138–143.

Hu C, Tian S, Lin L, Zhang J, Ding H. Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 and tumor infiltrating lymphocytes in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2020; 102: 104560.

Hu C, You W, Kong D, Huang Y, Lu J, Zhao M, et al. Tertiary Lymphoid Structure-Associated B Cells Enhance CXCL13+CD103+CD8+ Tissue-Resident Memory T-Cell Response to Programmed Cell Death Protein 1 Blockade in Cancer Immunotherapy. *Gastroenterology* 2024; 166: 1069–1084.

Huang Z, Zheng S, Ding S, Wei Y, Chen C, Liu X, et al. Prognostic role of programmed cell death ligand-1 expression in head and neck cancer treated with programmed cell death protein-1/programmed cell death ligand-1 inhibitors: A meta-analysis based on clinical trials. *J Cancer Res Ther* 2021; 17: 676–687.

Ida S, Takahashi H, Kawabata-Iwakawa R, Mito I, Tada H, Chikamatsu K. Tissue-resident memory T cells correlate with the inflammatory tumor microenvironment and improved prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2021; 122: 105508.

Jiang A-M, Ren M-D, Liu N, Gao H, Wang J-J, Zheng X-Q, et al. Tumor Mutation Burden, Immune Cell Infiltration, and Construction of Immune-Related Genes Prognostic Model in Head and Neck Cancer. *Int J Med Sci* 2021; 18: 226–238.

Johnson DE, Burtneess B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020; 6: 92.

Kim Y, Shin Y, Kang GH. Prognostic significance of CD103+ immune cells in solid tumor: a systemic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2019; 9: 3808.

Kowalski LP, Sanabria A. Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2007; 27: 113–117.

Kumar BV, Ma W, Miron M, Granot T, Guyer RS, Carpenter DJ, et al. Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell Rep* 2017; 20: 2921–2934.

Lai C, Coltart G, Shapanis A, Healy C, Alabdulkareem A, Selvendran S, et al. CD8+CD103+ tissue-resident memory T cells convey reduced protective immunity in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Immunother Cancer* 2021; 9: e001807.

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J-J, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2019; 381: 1535–1546.

Leddon JL, Gulati S, Haque S, Allen C, Palackdharry S, Mathews M, et al. Phase II Trial of Adjuvant Nivolumab Following Salvage Resection in Patients with Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res* 2022; 28: 3464–3472.

Lee HT, Lee SH, Heo Y-S. Molecular Interactions of Antibody Drugs Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in Immuno-Oncology. *Molecules* 2019; 24: 1190.

de Leeuw JR, de Graeff A, Ros WJ, Blijham GH, Hordijk GJ, Winnubst JA. Prediction of depression 6 months to 3 years after treatment of head and neck cancer. *Head Neck* 2001; 23: 892–898.

de Leeuw JR, de Graeff A, Ros WJ, Blijham GH, Hordijk GJ, Winnubst JA. Prediction of depressive symptomatology after treatment of head and neck cancer: the influence of pre-treatment physical and depressive symptoms, coping, and social support. *Head Neck* 2000; 22: 799–807.

Liu B, Zhang Y, Wang D, Hu X, Zhang Z. Single-cell meta-analyses reveal responses of tumor-reactive CXCL13⁺ T cells to immune-checkpoint blockade. *Nat Cancer* 2022; 3: 1123–1136.

Liu H, Zhu R, Liu C, Ma R, Wang L, Chen B, et al. Evaluation of Decalcification Techniques for Rat Femurs Using HE and Immunohistochemical Staining. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 9050754.

Lodi G, Franchini R, Warnakulasuriya S, Varoni EM, Sardella A, Kerr AR, et al. Interventions for treating oral leukoplakia to prevent oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 7: CD001829.

Lubin JH, Purdue M, Kelsey K, Zhang Z-F, Winn D, Wei Q, et al. Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol* 2009; 170: 937–947.

Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, Taube JM, Westra WH, Akpeng B, et al. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2013; 73: 1733–1741.

Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, Boffetta P, Niu S, Brasure J, et al. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B: 181–187.

Mami-Chouaib F, Blanc C, Cognac S, Hans S, Malenica I, Granier C, et al. Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. *J Immunother Cancer* 2018; 6: 87.

Mansh M. Ipilimumab and cancer immunotherapy: a new hope for advanced stage melanoma. *Yale J Biol Med* 2011; 84: 381–389.

Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity* 2019; 50: 778–795.

Misono S, Weiss NS, Fann JR, Redman M, Yueh B. Incidence of suicide in persons with cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4731–4738.

Mita Y, Kimura MY, Hayashizaki K, Koyama-Nasu R, Ito T, Motohashi S, et al. Crucial role of CD69 in anti-tumor immunity through regulating the exhaustion of tumor-infiltrating T cells. *Int Immunol* 2018; 30: 559–567.

Mollaoglu N. Oral lichen planus: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000; 38: 370–377.

Molodtsov A, Turk MJ. Tissue Resident CD8 Memory T Cell Responses in Cancer and Autoimmunity. *Front Immunol* 2018; 9: 2810.

Morse DE, Psoter WJ, Cleveland D, Cohen D, Mohit-Tabatabai M, Kosis DL, et al. Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. *Cancer Causes Control* 2007; 18: 919–929.

Murtojärvi S, Malaspina S, Kinnunen I, Tuokkola T, Honka M-J, Saunavaara V, et al. Diagnostic Accuracy of 18F-FDG-PET/CT and 18F-FDG-PET/MRI in Detecting Locoregional Recurrence of HNSCC 12 Weeks after the End of Chemoradiotherapy: Single-Center Experience with PET/MRI. *Contrast Media Mol Imaging* 2022; 2022: 8676787.

Ngamphaiboon N, Chureemas T, Siripoon T, Arsa L, Trachu N, Jiarpinitnun C, et al. Characteristics and impact of programmed death-ligand 1 expression, CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes, and p16 status in head and neck squamous cell carcinoma. *Med Oncol* 2019; 36: 21.

Nguyen NP, Frank C, Moltz CC, Vos P, Smith HJ, Karlsson U, et al. Impact of dysphagia on quality of life after treatment of head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 61: 772–778.

Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 252–264.

Park JC, Krishnakumar HN, Saladi SV. Current and Future Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitors in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Curr Oncol* 2022; 29: 4185–4198.

Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, Cassisi NJ, Million RR. An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 39: 137–148.

Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Res Health* 2006; 29: 193–198.

Peng S, Xiao F, Chen M, Gao H. Tumor-Microenvironment-Responsive Nanomedicine for Enhanced Cancer Immunotherapy. *Adv Sci (Weinh)* 2022; 9: e2103836.

Qi X, Jia B, Zhao X, Yu D. Advances in T-cell checkpoint immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Onco Targets Ther* 2017; 10: 5745–5754.

Qiao X-W, Jiang J, Pang X, Huang M-C, Tang Y-J, Liang X-H, et al. The Evolving Landscape of PD-1/PD-L1 Pathway in Head and Neck Cancer. *Front Immunol* 2020; 11: 1721.

Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2021; 124: 359–367.

Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia--a review. *Oral Oncol* 2005; 41: 551–561.

Ren S, Lan T, Wu F, Chen S, Jiang X, Huo C, et al. Intratumoral CD103+ CD8+ T cells predict response to neoadjuvant chemoimmunotherapy in advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Commun (Lond)* 2023; 43: 1143–1163.

Reyes-Gibby CC, Anderson KO, Merriman KW, Todd KH, Shete SS, Hanna EY. Survival patterns in squamous cell carcinoma of the head and neck: pain as an independent prognostic factor for survival. *J Pain* 2014; 15: 1015–1022.

Schneider S, Kadletz L, Wiebringhaus R, Kenner L, Selzer E, Füreder T, et al. PD-1 and PD-L1 expression in HNSCC primary cancer and related lymph node metastasis - impact on clinical outcome. *Histopathology* 2018; 73: 573–584.

Schwab KS, Kristiansen G, Schild HH, Held SEA, Heine A, Brossart P. Successful Treatment of Refractory Squamous Cell Cancer of the Head and Neck with Nivolumab and Ipilimumab. *Case Rep Oncol* 2018; 11: 17–20.

Shimizu S, Hiratsuka H, Koike K, Tsuchihashi K, Sonoda T, Ogi K, et al. Tumor-infiltrating CD8+ T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med* 2019; 8: 80–93.

Smith JD, Bellile EL, Ellsperman SE, Heft-Neal ME, Mann JE, Birkeland AC, et al. Prognostic value of CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes and programmed death ligand-1

(PD-L1) combined positive score in recurrent laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2022; 135: 106226.

Starska K, Głowacka E, Kulig A, Lewy-Trenda I, Bryś M, Lewkowicz P. The role of tumor cells in the modification of T lymphocytes activity--the expression of the early CD69+, CD71+ and the late CD25+, CD26+, HLA/DR+ activation markers on T CD4+ and CD8+ cells in squamous cell laryngeal carcinoma. Part I. *Folia Histochem Cytobiol* 2011; 49: 579–592.

Suárez C, Rodrigo JP, Ferlito A, Cabanillas R, Shaha AR, Rinaldo A. Tumours of familial origin in the head and neck. *Oral Oncol* 2006; 42: 965–978.

Taube JM, Akturk G, Angelo M, Engle EL, Gnjjatic S, Greenbaum S, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation. *J Immunother Cancer* 2020; 8: e000155.

Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994; 15: 479–483.

Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* 2018; 33: 547–562.

Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, Garje R, Chandra AB. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers (Basel)* 2020; 12: 738.

de Vicente JC, Rodríguez-Santamarta T, Rodrigo JP, Blanco-Lorenzo V, Allonca E, García-Pedrero JM. PD-L1 Expression in Tumor Cells Is an Independent Unfavorable Prognostic Factor in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2019; 28: 546–554.

Vidiri A, Ruscito P, Pichi B, Pellini R, Covello R, Sperduti I, et al. Oral cavity and base of the tongue tumors. Correlation between clinical, MRI and pathological staging of primary tumor. *J Exp Clin Cancer Res* 2007; 26: 575–582.

Vos JL, Elbers JBW, Krijgsman O, Traets JJH, Qiao X, van der Leun AM, et al. Neoadjuvant immunotherapy with nivolumab and ipilimumab induces major pathological responses in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Commun* 2021; 12: 7348.

Walsh JE, Lathers DMR, Chi AC, Gillespie MB, Day TA, Young MRI. Mechanisms of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 2007; 8: 227–238.

Wanderley CW, Colón DF, Luiz JPM, Oliveira FF, Viacava PR, Leite CA, et al. Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner. *Cancer Res* 2018; 78: 5891–5900.

Wang B, Wu S, Zeng H, Liu Z, Dong W, He W, et al. CD103+ Tumor Infiltrating Lymphocytes Predict a Favorable Prognosis in Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder. *J Urol* 2015; 194: 556–562.

Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 486–499.

Windon MJ, D'Souza G, Rettig EM, Westra WH, van Zante A, Wang SJ, et al. Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer* 2018; 124: 2993–2999.

Xiao Y, Li H, Mao L, Yang QC, Fu LQ, Wu CC, et al. CD103+ T and Dendritic Cells Indicate a Favorable Prognosis in Oral Cancer. *J Dent Res* 2019; 98: 1480–1487.

Zaker Shahrak A, Zor F, Kanatas A, Acikel C, Sapountzis S, Nicoli F, et al. Morphological and morphometric evaluation of the ilium, fibula, and scapula bones for oral and maxillo-facial reconstruction. *Microsurgery* 2014; 34: 638–645.

Zhang L, Chen Yanhui, Wang H, Xu Z, Wang Y, Li S, et al. Massive PD-L1 and CD8 double positive TILs characterize an immunosuppressive microenvironment with high mutational burden in lung cancer. *J Immunother Cancer* 2021; 9: e002356.

Zhang Y, Li L, Zheng W, Zhang L, Yao N. CD8⁺ T-cell exhaustion in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma determines poor prognosis. *Ann Transl Med* 2022; 10: 273.

Zhu Y, Zhang S, Sun J, Wang T, Liu Q, Wu G, et al. Cigarette smoke promotes oral leukoplakia via regulating glutamine metabolism and M2 polarization of macrophage. *Int J Oral Sci* 2021; 13: 25.

8.2 Internetquellen

AWMF online, 2021: S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. https://register.awmf.org/assets/guidelines/007-100OLI_S3-Diagnostik-Therapie-Mundhoehlenkarzinom_2021-03.pdf (Zugriffsdatum: 18.08.2022)

Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (DGMKG), 2019: Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. https://www.dgzmk.de/documents/10165/1373255/LL_007-092_S2k_orale+Vorläuferläsion_lang_2020.pdf/c13b5292-aa2c-4cee-891c-07ac9fe30d01 (Zugriffsdatum: 06.06.2023)

Kreppel M, 2011: Therapie von oralen Leukoplakien und malignen Mundschleimhautläsionen. <https://www.zwp-online.info/fachgebiete/oralchirurgie/mundschleimhauterkrankungen/therapie-von-oralen-leukoplakien-und-malignen-mundschleimhautlaesionen> (Zugriffsdatum: 23.06.2022)

National Cancer Institute, 2015: Immune Checkpoint Inhibitors. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/checkpoint-inhibitors> (Zugriffsdatum: 13.05.2025)

9. Anhang

Im Anhang sind die für QuPath verwendeten technischen Einstellungen dargestellt, die für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der Tissue-Microarray-Proben relevant sind und die Transparenz sowie Nachvollziehbarkeit der Analyse gewährleisten. Die digitalisierten Gewebeschnitte wurden mit QuPath hinsichtlich der Färbintensität einzelner Zellen untersucht.

Zunächst erfolgte eine Trennung der Färbungen in ihre beiden Bestandteile: Hämatoxylin, das die Zellkerne blau einfärbt, und DAB, das braune Signale für immunreaktive Zellen liefert. Diese Farbmischung ermöglicht eine klare Unterscheidung zwischen gefärbten und ungefärbten Zellstrukturen. Im nächsten Schritt erkannte QuPath jede einzelne Zelle automatisch und bestimmte deren Größe und Form. Anschließend wurde die Intensität der DAB-Färbung analysiert, sodass die Zellen für alle vier untersuchten immunhistochemischen Marker objektiv in „negativ“ oder „positiv“ klassifiziert werden konnten.

Anhang 1: CD8 immunhistochemische Färbung

```
setImageType('BRIGHTFIELD_H_DAB'); setColorDeconvolutionStains({'Name':"H-DAB
default", "Stain 1" : "Hematoxylin", "Values 1" : "0.65111 0.70119 0.29049", "Stain 2" :
"DAB", "Values 2" : "0.26917 0.56824 0.77759", "Background" : " 255 255 255"}); run-
Plugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection',{'detectionImageBright-
field':"HematoxylinOD","requestedPixelSizeMicrons":0.5,"backgroundRadiusMi-
crons":8.0,"backgroundByReconstruction":true,"medianRadiusMicrons":0.0,"sigma-
Microns":1.5,"minAreaMicrons":10.0,"maxAreaMicrons":400.0,"threshold":0.1,"maxBack-
ground":2.0,"watershedPostProcess":true,"excludeDAB":false,"cellExpansionMi-
crons":5.0,"includeNuclei":true,"smoothBoundaries":true,"makeMeasurements":true,
"thresholdCompartment":"Nucleus: DAB OD mean","thresholdPositive1":0.2,"thresh-
oldPositive2":0.4,"thresholdPositive3":0.6000000000000001,"singleThreshold":true})
saveAnnotationMeasurements('/Users/Dahlia/Desktop/Prof. Toma/HNO Kohorte/Ko-
```

```
horte/BTMA65/) setColorDeconvolutionStains({'Name': "H-DAB default", "Stain 1": "Hematoxylin", "Values 1": "0.65111 0.70119 0.29049", "Stain 2": "DAB", "Values 2": "0.26917 0.56824 0.77759", "Background": "255 255 255"});
```

Anhang 2: CD69 immunhistochemische Färbung

```
setImageType('BRIGHTFIELD_H_DAB'); setColorDeconvolutionStains({'Name': "H-DAB default", "Stain 1": "Hematoxylin", "Values 1": "0.65111 0.70119 0.29049", "Stain 2": "DAB", "Values 2": "0.26917 0.56824 0.77759", "Background": "255 255 255"});
runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection',{'detectionImageBrightfield':"HematoxylinOD","requestedPixelSizeMicrons":0.5,"backgroundRadiusMicrons":8.0,"backgroundByReconstruction":true,"medianRadiusMicrons":0.0,"sigmaMicrons":1.5,"minAreaMicrons":10.0,"maxAreaMicrons":400.0,"threshold":0.1,"maxBackground":2.0,"watershedPostProcess":true,"excludeDAB":false,"cellExpansionMicrons":5.0,"includeNuclei":true,"smoothBoundaries":true,"makeMeasurements":true,"thresholdCompartment":"Nucleus: DAB OD mean","thresholdPositive1":0.2,"thresholdPositive2":0.4,"thresholdPositive3":0.6000000000000001,"singleThreshold":true})
saveAnnotationMeasurements('/Users/Dahlia/Desktop/Prof. Toma/HNO Kohorte/Kohorte/BTMA65/') setColorDeconvolutionStains({'Name': "H-DAB default", "Stain 1": "Hematoxylin", "Values 1": "0.65111 0.70119 0.29049", "Stain 2": "DAB", "Values 2": "0.26917 0.56824 0.77759", "Background": "255 255 255"});
```

Anhang 3: CD103 immunhistochemische Färbung

```
setImageType('BRIGHTFIELD_H_DAB');setColorDeconvolutionStains({'Name': "H-DAB default", "Stain 1": "Hematoxylin", "Values 1": "0.65111 0.70119 0.29049", "Stain 2": "DAB", "Values 2": "0.26917 0.56824 0.77759", "Background": "255 255 255"}); runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection',{'detectionImageBrightfield':"HematoxylinOD","requestedPixelSizeMicrons":0.5,"backgroundRadiusMicrons":8.0,"backgroundByReconstruction":true,"medianRadiusMicrons":0.0,"sigmaMicrons":1.5,"minAreaMicrons":10.0,"maxAreaMicrons":400.0,"threshold":0.1,"maxBackground":2.0,"watershedPostProcess":true,"excludeDAB":false,"cellExpansionMi-
```

```
crons":5.0,"includeNuclei":true,"smoothBoundaries":true,"makeMeasure-
ments":true,"thresholdCompartment":"Nucleus:DABODmean","thresholdPositive1":0.2,
"thresholdPositive2":0.4,"thresholdPositive3":0.6000000000000001,"singleThresh-
old":true}') runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionIm-
ageBrightfield":"Hematoxylin OD","requestedPixelSizeMicrons":0.5,"backgroundRadius-
Microns":8.0,"backgroundByReconstruction":true,"medianRadiusMicrons":0.0,"sigma-
Microns":1.5,"minAreaMicrons":10.0,"maxAreaMicrons":400.0,"threshold":0.1,"maxBack-
ground":2.0,"watershedPostProcess":true,"excludeDAB":false,"cellExpansionMi-
crons":5.0,"includeNuclei":true,"smoothBoundaries":true,"makeMeasure-
ments":true,"thresholdCompartment":"Nucleus:DAB OD mean","thresholdPosi-
tive1":0.2,"thresholdPositive2":0.4,"thresholdPositive3":0.6000000000000001,"sin-
gleThreshold":true}')
```

```
runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionImageBright-
field":"Hematoxylin OD","requestedPixelSizeMicrons":0.5,"backgroundRadiusMi-
crons":8.0,"backgroundByReconstruction":true,"medianRadiusMicrons":0.0,"sigma-
Microns":1.5,"minAreaMicrons":10.0,"maxAreaMicrons":400.0,"threshold":0.1,"maxBack-
ground":2.0,"watershedPostProcess":true,"excludeDAB":false,"cellExpansionMi-
crons":5.0,"includeNuclei":true,"smoothBoundaries":true,"makeMeasure-
ments":true,"thresholdCompartment":"Nucleus: DAB OD mean","thresholdPosi-
tive1":0.2,"thresholdPositive2":0.4,"thresholdPositive3":0.6000000000000001,"sin-
gleThreshold":true}') setColorDeconvolutionStains({'Name' : "H-DAB default", "Stain 1" :
"Hematoxylin", "Values 1" : "0.65111 0.70119 0.29049", "Stain 2" : "DAB", "Values 2" :
"0.26917 0.56824 0.77759", "Background" : " 255 255 255"}); runPlugin('qupath.im-
agej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionImageBrightfield":"Hematoxylin
OD","requestedPixelSizeMicrons":0.5,"backgroundRadiusMicrons":8.0,"back-
groundByReconstruction":true,"medianRadiusMicrons":0.0,"sigmaMicrons":1.5,"minA-
reaMicrons":10.0,"maxAreaMicrons":400.0,"threshold":0.1,"maxBackground":2.0,"water-
shedPostProcess":true,"excludeDAB":false,"cellExpansionMicrons":5.0,"includeNu-
clei":true,"smoothBoundaries":true,"makeMeasurements":true,"thresholdCompart-
ment":"Nucleus: DAB OD mean","thresholdPositive1":0.2,"thresholdPosi-
```

```
tive2":0.4,"thresholdPositive3":0.6000000000000001,"singleThreshold":true}') saveAnnotationMeasurements('/Users/Dahlia/Desktop/Prof. Toma/HNO Kohorte/Kohorte/BTMA65/') setColorDeconvolutionStains({'Name': "H-DAB default", "Stain 1": "Hematoxylin", "Values 1": "0.65111 0.70119 0.29049", "Stain 2": "DAB", "Values 2": "0.26917 0.56824 0.77759", "Background": "255 255 255"});
```

Anhang 4: PD-1 immunhistochemische Färbung

```
setImageType('BRIGHTFIELD_H_DAB'); setColorDeconvolutionStains({'Name': "H-DAB default", "Stain 1": "Hematoxylin", "Values 1": "0.65111 0.70119 0.29049", "Stain 2": "DAB", "Values 2": "0.26917 0.56824 0.77759", "Background": "255 255 255"});
```

```
runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionImageBrightfield": "Hematoxylin OD", "requestedPixelSizeMicrons": 0.5, "backgroundRadiusMicrons": 8.0, "backgroundByReconstruction": true, "medianRadiusMicrons": 0.0, "sigmaMicrons": 1.5, "minAreaMicrons": 10.0, "maxAreaMicrons": 400.0, "threshold": 0.1, "maxBackground": 2.0, "watershedPostProcess": true, "excludeDAB": false, "cellExpansionMicrons": 5.0, "includeNuclei": true, "smoothBoundaries": true, "makeMeasurements": true, "thresholdCompartment": "Nucleus: DAB OD mean", "thresholdPositive1": 0.2, "thresholdPositive2": 0.4, "thresholdPositive3": 0.6000000000000001, "singleThreshold": true}')
```

```
runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionImageBrightfield": "Hematoxylin OD", "requestedPixelSizeMicrons": 0.5, "backgroundRadiusMicrons": 8.0, "backgroundByReconstruction": true, "medianRadiusMicrons": 0.0, "sigmaMicrons": 1.5, "minAreaMicrons": 10.0, "maxAreaMicrons": 400.0, "threshold": 0.1, "maxBackground": 2.0, "watershedPostProcess": true, "excludeDAB": false, "cellExpansionMicrons": 5.0, "includeNuclei": true, "smoothBoundaries": true, "makeMeasurements": true, "thresholdCompartment": "Nucleus: DAB OD mean", "thresholdPositive1": 0.2, "thresholdPositive2": 0.4, "thresholdPositive3": 0.6000000000000001, "singleThreshold": true}')
```

```
runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectionImageBrightfield": "Hematoxylin OD", "requestedPixelSizeMicrons": 0.5, "backgroundRadiusMicrons": 8.0, "backgroundByReconstruction": true, "medianRadiusMi-
```

```

crons":0.0,"sigmaMicrons":1.5,"minAreaMicrons":10.0,"maxAreaMicrons":400.0,"thresh-
old":0.1,"maxBackground":2.0,"watershedPostProcess":true,"excludeDAB":false,"cel-
lExpansionMicrons":5.0,"includeNuclei":true,"smoothBoundaries":true,"makeMeasure-
ments":true,"thresholdCompartment":"Nucleus:  DAB  OD  mean","thresholdPosi-
tive1":0.2,"thresholdPositive2":0.4,"thresholdPositive3":0.6000000000000001,"sin-
gleThreshold":true}') runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"de-
tectionImageBrightfield":"Hematoxylin      OD","requestedPixelSizeMicrons":0.5,"back-
groundRadiusMicrons":8.0,"backgroundByReconstruction":true,"medianRadiusMi-
crons":0.0,"sigmaMicrons":1.5,"minAreaMicrons":10.0,"maxAreaMicrons":400.0,"thresh-
old":0.1,"maxBackground":2.0,"watershedPostProcess":true,"excludeDAB":false,"cel-
lExpansionMicrons":5.0,"includeNuclei":true,"smoothBoundaries":true,"makeMeasure-
ments":true,"thresholdCompartment":"Nucleus:  DAB  OD  mean","thresholdPosi-
tive1":0.2,"thresholdPositive2":0.4,"thresholdPositive3":0.6000000000000001,"sin-
gleThreshold":true}') runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"de-
tectionImageBrightfield":"Hematoxylin      OD","requestedPixelSizeMicrons":0.5,"back-
groundRadiusMicrons":8.0,"backgroundByReconstruction":true,"medianRadiusMi-
crons":0.0,"sigmaMicrons":1.5,"minAreaMicrons":10.0,"maxAreaMicrons":400.0,"thresh-
old":0.1,"maxBackground":2.0,"watershedPostProcess":true,"excludeDAB":false,"cel-
lExpansionMicrons":5.0,"includeNuclei":true,"smoothBoundaries":true,"makeMeasure-
ments":true,"thresholdCompartment":"Nucleus:  DAB  OD  mean","thresholdPosi-
tive1":0.2,"thresholdPositive2":0.4,"thresholdPositive3":0.6000000000000001,"singleTh-
reshold":true}') runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"delectio-
nImageBrightfield":"Hematoxylin  OD","requestedPixelSizeMicrons":0.5,"backgroundRa-
diusMicrons":8.0,"backgroundByReconstruction":true,"medianRadiusMicrons":0.0,"sig-
maMicrons":1.5,"minAreaMicrons":10.0,"maxAreaMicrons":400.0,"threshold":0.1,"max-
Background":2.0,"watershedPostProcess":true,"excludeDAB":false,"cellExpansion-
Microns":5.0,"includeNuclei":true,"smoothBoundaries":true,"makeMeasure-
ments":true,"thresholdCompartment":"Nucleus:  DAB  OD  mean","thresholdPosi-
tive1":0.2,"thresholdPositive2":0.4,"thresholdPositive3":0.6000000000000001,"singleTh-
reshold":true}') runPlugin('qupath.imagej.detect.cells.PositiveCellDetection', '{"detectio-
nImageBrightfield":"Hematoxylin  OD","requestedPixelSizeMicrons":0.5,"backgroundRa-

```

```

diusMicrons":8.0,"backgroundByReconstruction":true,"medianRadiusMicrons":0.0,"sigmaMicrons":1.5,"minAreaMicrons":10.0,"maxAreaMicrons":400.0,"threshold":0.1,"maxBackground":2.0,"watershedPostProcess":true,"excludeDAB":false,"cellExpansionMicrons":5.0,"includeNuclei":true,"smoothBoundaries":true,"makeMeasurements":true,"thresholdCompartment":"Nucleus: DAB OD mean","thresholdPositive1":0.2,"thresholdPositive2":0.4,"thresholdPositive3":0.6000000000000001,"singleThreshold":true}') saveAnnotationMeasurements('/Users/Dahlia/Desktop/Prof. Toma/HNO Kohorte/Kohorte/BTMA65/') setColorDeconvolutionStains({'"Name" : "H-DAB default", "Stain 1" : "Hematoxylin", "Values 1" : "0.65111 0.70119 0.29049", "Stain 2" : "DAB", "Values 2" : "0.26917 0.56824 0.77759", "Background" : " 255 255 255"}');

```

10. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in dem Institut der Pathologie unter Betreuung von Frau Professor Toma durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sanders als Betreuerin und Ratgeberin in allen Fragen. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Sanders von mir eigenständig und in dem Färbeprozess mit Unterstützung durch Frau Steiner aus dem immunhistochemischen Labor durchgeführt. Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde in Zusammenarbeit mit Frau Professor Dr. Toma zusammengestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch mich.

Bei der Erstellung dieser Arbeit verwendete ich ChatGPT (OpenAI, 2025), um bei der Recherche von Studien unterstützende Hilfe zu empfangen sowie um die Sprache des Manuskripts zu verbessern. Nach der Verwendung dieses Tools habe ich die entsprechenden Passagen überprüft, bearbeitet und übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift. Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2022 bis Juli 2025 am Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Bonn unter der Anleitung von Frau Professor Dr. Toma und Frau Dr. Sanders ausgeführt.

Mein größter Dank geht an meine Doktormutter Professor Dr. Marieta Toma für die Themenfindung, die Aufnahme meiner Promotion am Pathologischen Institut sowie für die wertvollen Anregungen und die Unterstützung, auch in schwierigen Zeiten.

Zudem möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Christine Sanders für die hervorragende Betreuung und das außerordentliche Engagement danken. Ihre niemals endende Hilfe und Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem danken möchte ich Frau Steiner und ihrem Team aus dem Immunhistochemischen Labor, die mich bei der Färbung der Patientenproben unterstützt haben.

Zudem gilt letztlich ein besonderer Dank an meine Familie und Freunde für das Verständnis, die Geduld und den Beistand während dieser Zeit.