

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Leitung: Prof. Dr. med. C. Betz

The prognostic impact of B7-H3 and B7-H4 in head and neck squamous cell carcinoma

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Mara Borgmann
aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.01.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Jasmin Wellbrock

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Adrian Münscher

Inhaltsverzeichnis

1. Publikation	4
2. Darstellung der Publikation	19
2.1 Titel	19
2.2 Einfache Zusammenfassung	19
2.3 Abstract	19
2.4 Einleitung	20
2.5 Ziele und Hypothese	22
2.6 Material und Methoden	23
2.7 Ergebnisse	25
2.8 Diskussion	28
2.9 Schlussfolgerung	30
3. Literaturverzeichnis	32
4. Abkürzungsverzeichnis	36
5. Zusammenfassung	37
5.1 Kurzfassung	37
5.2 Summary	38
6. Erklärung des Eigenanteils	39
7. Danksagung	41
8. Lebenslauf	42
9. Eidesstattliche Versicherung	43

1. Publikation

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology
https://doi.org/10.1007/s00432-022-04244-2

RESEARCH



The prognostic impact of B7-H3 and B7-H4 in head and neck squamous cell carcinoma

Mara Borgmann^{1,2} · Agnes Oetting^{1,3} · Felix Meyer³ · Nikolaus Möckelmann^{1,4} · Conrad Droste⁵ · Clara Marie von Bargen⁶ · Christina Möller-Koop⁶ · Melanie Witt⁶ · Kerstin Borgmann³ · Kai Rothkamm³ · Christian Betz¹ · Adrian Münscher^{1,4} · Till Sebastian Clauditz⁶ · Thorsten Rieckmann^{1,3}

Received: 25 May 2022 / Accepted: 29 July 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Purpose Immune checkpoint inhibition is a therapeutic option in many cancer entities. In head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) targeting of the PD-1/PD-L1 (B7-H1) axis is approved in recurrent/metastatic disease and is being explored in the curative setting. Here, we evaluated two related members of the B7 family, B7-H3 & B7-H4, for their prognostic impact under standard treatment.

Methods A tissue microarray (TMA) of a single center HNSCC cohort was stained for B7-H3 and B7-H4. Staining intensity and the number of tumor cells stained were assessed, and the expression was scored according to an established algorithm. Staining scores were correlated with clinicopathological parameters and associated with patient survival. mRNA levels of both proteins were associated with patient outcome using the TCGA dataset.

Results mRNA levels of B7-H3 and B7-H4 were not significantly associated with patient survival. TMA analysis revealed interpretable protein staining in 408 samples. Strong staining was the most frequent category for B7-H3 and no staining for B7-H4. In patients with p16-negative oropharyngeal SCC (OPSCC) and in a pooled cohort consisting of p16-negative OPSCC, laryngeal, hypopharyngeal and oral cavity SCC, strong B7-H3 expression was associated with better overall survival. For the latter cohort, this was in part due to reduced lymph node involvement. B7-H3 expression in p16-positive OPSCC and B7-H4 expression were not associated with outcome.

Conclusion Despite a possible role in tumor immune escape, B7-H3 was associated with favorable prognosis in HPV-negative HNSCC in our cohort. The underlying mechanisms and a potential impact for B7-H3 targeting remain to be elucidated.

Keywords HNSCC · B7-H3 · CD276 · B7-H4 · VCTN1 · Tissue microarray (TMA) · Prognosis · Biomarker

Introduction

Head and neck cancer represents the sixth most common human malignancy, with approximately 450,000 new cases of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) diagnosed annually worldwide (Cohen et al. 2018; Zhuang and

Till Sebastian Clauditz and Thorsten Rieckmann contributed equally to this work.

✉ Thorsten Rieckmann
trieckmann@uke.de

¹ Department of Otorhinolaryngology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

² Department of Otorhinolaryngology, Asklepios Klinik Nord, Hamburg, Germany

³ Department of Radiotherapy and Radiation Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁴ Department of Otorhinolaryngology, Marienkrankenhaus Hamburg, Hamburg, Germany

⁵ University Cancer Center Hamburg (UCCH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁶ Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Published online: 18 August 2022

Springer

Xu 2020). At time of diagnosis most patients present with advanced stage disease. Outcome is favorable in early-stage disease with 5-year survival rates ranging from 75 to 90%. However, most patients present with either locally advanced disease with a five-year survival rate of approximately 50% (Du et al. 2019). Standard curative treatment consists of surgery and/or (chemo)radiation. The choice of primary treatment in part depends on the geographical region, and multimodal treatment is common in advanced stages. The only accepted prognostic biomarker is the presence of human papillomavirus (HPV) or the surrogate marker p16 in oropharyngeal tumors, where they confer a decidedly favorable prognosis, which has led to an adjustment in the TNM staging system (Huang and O'Sullivan 2017).

An effective way to improve therapeutic efficacy for HNSCC, as in many other tumor entities, is to block immune checkpoint receptors (Robert 2020). A multitude of studies have shown that T-lymphocytes, as part of the adaptive immune system, play a central role in anti-tumor immunity (Mami-Chouaib et al. 2018; St Paul and Ohashi 2020; Waldman et al. 2020). The activity status of T-lymphocytes as well as other immune cells, such as tumor-associated macrophages and NK cells, is regulated by a variety of immune modulating receptors, including immune checkpoint receptors, which play critical roles in the induction and maintenance of immune tolerance to normal tissue. The B7 immunoglobulin superfamily contains both, immune stimulators and potent immune checkpoint receptors including the well-examined representatives PD-L1 and PD-L2 (B7-H1, B7-DC) (Pardoll 2012). Inhibition of the PD-1/PD-L1 axis with or without chemotherapy has been shown to improve overall survival (OS) in first-line treatment of PD-L1-expressing recurrent/metastatic HNSCC as compared to the chemotherapy plus cetuximab-based EXTREME regimen (Burtneff et al. 2019). However, despite these recent advances, the response rates towards immune checkpoint inhibition in HNSCC are far from being satisfactory (Ferris et al. 2018; Burtneff et al. 2019).

Further immunoinhibitory members of the B7 superfamily, which, similar to PD-L1, are expressed on the surface of a variety of normal tissue but also tumor cells, include B7-H3 (=CD276) and B7-H4 (=VCTN1). In an oncological context, high expression of B7-H3 has been reported in several cancer types, including melanoma, glioma, breast and ovarian cancer, hepatocellular, colorectal, pancreatic, and non-small cell lung carcinoma (NSCLC). High expression of B7-H3 has been repeatedly described as a negative prognostic factor, for example in pancreatic, colon, hepatocellular, ovarian or breast cancer (Ingebrigtsen et al. 2012; Xu et al. 2016; Zheng et al. 2019). B7-H4 was reported to be expressed in various tumor types, such as spleen, lung, thymus, ovarian, breast, melanoma, gastric and renal cell carcinoma, NSCLC, esophageal, endometrial cancer, colorectal

and pancreatic cancer and has mostly been associated with worse clinical outcome across various cancer types (Xu et al. 2016; Meng et al. 2017; Ding et al. 2021).

For HNSCC, the role of both proteins for tumor progression and patient survival has not yet been conclusively demonstrated. Katayama et al. investigated the expression of B7-H3 in 37 samples from hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC) patients and observed a higher rate of distant metastasis after tumor-free periods in patients whose tumors showed higher B7-H3 expression (Katayama et al. 2011). Hu et al. reported high expression in 66.1% of HNSCC specimens and a correlation with poor survival in a cohort of 274 tumor samples (Hu et al. 2019) and Li et al. similarly reported of inferior survival upon high expression in a cohort of 122 patients with laryngeal SCC (LSCC) (Li et al. 2021). High expression levels of B7-H3 were associated with reduced T-cell infiltration (Katayama et al. 2011; Li et al. 2021). Recently, it has further been shown that expression of B7-H3 and subsequent immune evasion in HNSCC is regulated by a long non-coding RNA (LINC01123) through repression of miRNA(miR-214-3p)-mediated inhibition of B7-H3 expression (Li et al. 2022) and that especially HNSCC cancer stem cells (CSCs) utilize B7-H3 to evade immune surveillance. Anti-B7-H3 antibodies were shown to eliminate such CSCs in a CD8⁺T cell-dependent manner in an HNSCC mouse model (Wang et al. 2021). For B7-H4 there are only limited data regarding its potential prognostic impact in HNSCC. Wu et al. reported that in oral SCC, B7-H4 expression was associated with lymph node status and pathological grade. High expression was associated with poor overall survival (Wu et al. 2016). In LSCC co-expression of B7-H4 with markers of epithelial mesenchymal transition (EMT) was described, and overexpression of B7-H4 induced their expression in LSCC cells, suggesting a causative relationship (Chen et al. 2017).

In summary, B7-H3 and B7-H4 have both been described as prognostic markers in head and neck cancer but to date the data are sparse and often only related to specific subsites. As immunoregulatory factors, both proteins represent potential targets for immune checkpoint inhibition as an alternative to, or in combination with, current PD-1/PD-L1 targeting approaches. The anti-B7-H3 antibody enoblituzumab and the anti-B7-H4 antibody FPA 150 are already being tested in clinical trials. Since data on B7-H3 and B7-H4 expression patterns in HNSCC are still limited, mostly relate to small patient cohorts, and have not been studied together, we investigated the impact of both markers on patient survival in a retrospective single center patient cohort in a tissue microarray (TMA) format and the TCGA dataset.

Materials and methods

Clinical *In silico* analysis

Clinical- and mRNA expression data for B7-H3 or B7-H4 were extracted from the HNSCC TCGA cohort of the cBioPortal (<http://cbioportal.org>) (Cerami et al. 2012; Gao et al. 2013). For each tumor ($n = 516$), B7-H3 or B7-H4 gene expression was analyzed and the 25% of tumors with the highest and lowest gene expression were compared for overall patient survival. p -values were calculated using log-rank test.

Specimen collection and TMA construction

Survival and the clinicopathological data from HNSCC patients treated with curative intent at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf were analyzed retrospectively. Tumors were diagnosed between 1992 and 2013, with a vast majority of 95% diagnosed between 2000 and 2013. Tissue samples were either obtained from primary tumors during surgical resection or from diagnostic biopsies. The use of archived diagnostic leftover tissues and their analysis for research purposes as well as patient data analysis have been approved by local laws (HmbKHG, §12.1) and by the local ethics committee (Ethics commission Hamburg, WF-04909). The study has been carried out in compliance with the Helsinki Declaration.

Tissue samples utilized for TMA construction had been fixed in buffered 4% formalin and embedded in paraffin. TMA construction was performed as previously described (Bubendorf et al. 1999; Dancau et al. 2016). In brief, hematoxylin-eosin-stained sections were made from each selected primary tumor block to identify representative tumor regions. A tissue cylinder of 0.6 mm diameter was punched from each block using a homemade semi-automated tissue arrayer. For immunohistochemical staining, three-micrometer TMA sections were prepared using the Paraffin Sectioning Aid System (Instrumentics, Hackensack, NJ, USA).

Immunohistochemistry

Freshly cut TMA sections were analyzed in a single experiment in one day. After 10 min of peroxidase blocking with H₂O₂ (DAKO S2023) B7-H3 (monoclonal rabbit antibody; clone SP265; Zytomed) and B7-H4 (monoclonal mouse antibody, clone H74; Antibodies Online) antibodies were used for immunohistochemical staining. High temperature pretreatment of the slides was conducted in an autoclave in citrate buffer, pH 7.8, for 5 min. The Envision system (DAKO 5007) was used to visualize the immunostaining.

The staining was assessed separately by two experienced pathologists (TSC & CMvB) using a well-established scoring system based on staining intensity (0, 1, 2, 3—referring to absent, low, intermediate or high intensity) and the fraction of tumor cells stained (Simon et al. 2010; Steurer et al. 2021). The final IHC score (negative, weak, moderate, strong) is built from these parameters as follows: negative scores had a staining intensity of 0; weak scores had a staining intensity of 1 + in $\leq 70\%$ of tumor cells or a staining intensity of 2 + in $\leq 30\%$ of tumor cells; moderate scores had a staining intensity of 1 + in $> 70\%$ of tumor cells, a staining intensity of 2 + in $> 30\%$ and $\leq 70\%$ of tumor cells or a staining intensity of 3 in $\leq 30\%$ of tumor cells; and strong scores had a staining intensity of 2 + in $> 70\%$ of tumor cells or a staining intensity of 3 in $> 30\%$ of tumor cells. In the event of discrepancies, tissue spots were re-analyzed by both pathologists and a consensus result was assigned.

Analysis of patient survival

Statistical analysis was performed using R and Bioconductor environment (Huber et al. 2015) for data processing, analysis and evaluation. Survival analyses were performed according to the Kaplan–Meier method and the Log-rank test using the R packages “survival” and “survminer”, multivariate analyses were performed fitting a Cox proportional hazards regression model using the “survival” package (Therneau and Grambsch 2000; Kassambara and Kosinski 2018). Potential associations between variables were tested using the Pearson correlation co-efficient (R-packages: reshape and corplot, Wickham 2007; Wei and Simko 2017). All statistical analyses are to be considered exploratory. The reported p -values are two-sided and used as descriptive measures only.

Further data analyses

Depiction of protein expression scores were performed using GraphPad Prism 6.

Results

No clear association of B7-H3 and B7-H4 mRNA levels and patient survival

To investigate the effect of mRNA expression of B7-H3 and B7-H4 on survival in HNSCC, the expression of both markers was analyzed using the TCGA dataset (cBioportal.com). Figure 1 depicts overall survival (OS) in dependence of B7-H3 and B7-H4 expression based on the comparison of the lower and upper quartiles. High mRNA expression of B7-H3 showed a trend towards a negative prognostic

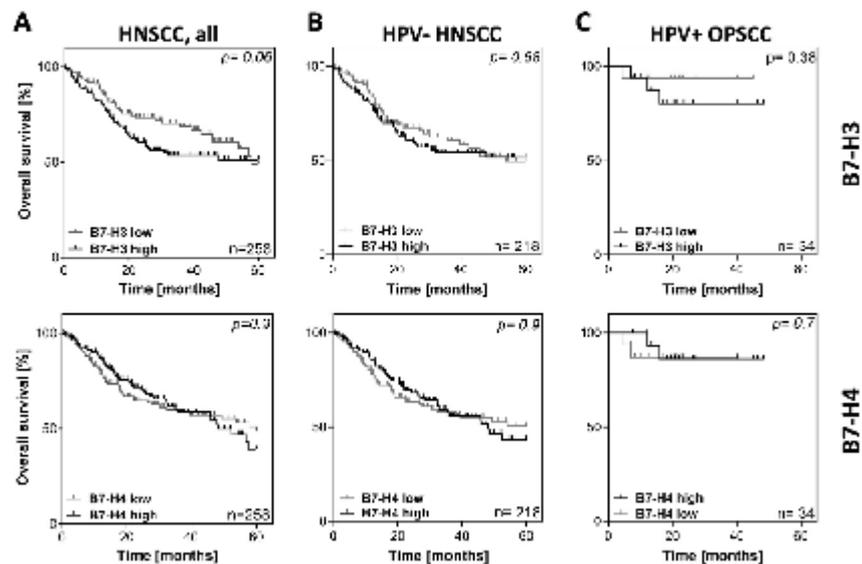


Fig. 1 Overall survival of patients in the HNSCC TCGA cohort with respect to B7-H3 and B7-H4 mRNA expression. Depicted are the upper (high) and lower (low) quartiles of cases based on the mRNA

expression levels of the respective proteins in the TCGA HNSCC cohort. **A** Whole cohort. **B** HPV- cohort. **C** HPV+OPSCC only. p-values were calculated using log-rank test

impact on OS in the whole cohort but the difference failed to reach significance ($p=0.06$) (Fig. 1A, top). No association or trend was observable for B7-H4 mRNA expression ($p=0.9$) (Fig. 1A, bottom). Due to the different biology of HPV-positive (HPV+) HNSCC, we next excluded all annotated HPV+ cases and the few OPSCC with unknown HPV/p16 status from the analysis. No clear differences were observed in the remaining HPV- tumors (Fig. 1B) or in a cohort consisting only of HPV+OPSCC, although, due to the low numbers of cases and events, the latter results should be interpreted with caution (Fig. 1C).

High B7-H3 and low B7-H4 protein expression in HNSCC

To assess the impact of B7-H3 and B7-H4 protein expression on patient survival in HNSCC, the expression of both proteins was analyzed in a retrospective cohort in a tissue micro array (TMA) format. All patients had been treated with curative intent at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. Overall, 398 and 395 samples showed interpretable staining for B7-H3 and B7-H4, respectively. OPSCC was the most frequent sub-entity (185), followed by LSCC (140), HSCC (51), and oral cavity tumors (23).

An overview of the clinicopathological characteristics of the patients and tumors is provided in Table 1.

In an established semiquantitative analysis, the immunohistochemical staining intensities of B7-H3 and B7-H4 were scored as 0, 1, 2 or 4 and the respective percentage of tumor cells was estimated (Fig. 2A). The final IHC score was built from both parameters with individual spots being categorized as *negative*, *weak*, *moderate* or *strong* (see "Materials and methods" for details). The staining of both proteins was mostly restricted to the plasma membrane and cytoplasm. Overall, a major difference in the expression of both proteins was observed. In the whole cohort and in each of the respective sublocations, the highest staining category *strong* was the most frequent one for B7-H3, whereas *negative* staining was the most frequent category for B7H4 (Fig. 2B). Normal tissue control spots of the TMA demonstrated far weaker B7-H3 expression as compared to the tumor spots. Only 3 of the overall 50 samples showed strong B7-H3 staining, while a complete lack of staining was observed in 29 samples. For B7-H4, expression was moderately enhanced in the normal tissue vs. the tumor samples with *weak* staining being the most frequent category (Supplementary Fig. 1). So while strong expression of B7-H3 is highly frequent in HNSCC and considerable expression of B7-H4 a rather rare event, we further assessed whether protein expression levels

Table 1 Clinicopathological characteristics of patient samples

Patient characteristics	
Interpretable staining, number (%)	
B7-H3 and/or B7-H4	408 (100)
B7-H3	398 (97.5)
B7-H4	395 (96.8)
Age, median (range)	61 (31–85)
Sex, number (%)	
Male	316 (77.5)
Female	90 (22.05)
n.a.	2 (0.5)
Location, number (%)	
Oropharynx	185 (45.3)
p16+ (% of OPSCC)	68 (36.8)
p16- (% of OPSCC)	93 (50.3)
p16 n.a. (% of OPSCC)	24 (13)
Larynx	140 (34.3)
Hypopharynx	51 (12.5)
Oral cavity	23 (5.6)
Nasopharynx	6 (1.5)
n.a.	3 (0.8)
T classification, number (%)	
T1	97 (23.8)
T2	112 (27.5)
T3	94 (23)
T4	97 (23.8)
n.a.	8 (1.9)
N classification, number (%)	
N0	184 (45.1)
N1	58 (14.2)
N2	141 (34.6)
N3	18 (4.4)
n.a.	7 (1.7)
Therapy, number (%)	
Surgery	135 (33.1)
Surgery + (chemo)radiation	189 (46.3)
Chemoradiation	50 (12.3)
Radiotherapy	10 (2.5)
Other	12 (2.9)
n.a.	12 (2.9)

T- and N-classification were performed according to the 7th edition of the Union for International Cancer Control (UICC). Classification represents clinical staging for tumors treated with definitive (chemo) radiation and pathological staging for resected tumors. For 24 spots of oropharyngeal tumors, p16 status was not available (n.a.) because of indistinct scoring (intermediate or high staining intensity in ≥ 40 but $< 70\%$ of tumor cells) or because of a lack of tumor tissue in the p16-stained tissue microarray section

were associated with each other or with T-, or N-stage. Correlation analyses revealed no clear associations for any of the two immune checkpoint receptors (Fig. 2C). To account for the different biology of HPV+ and HPV- HNSCC also

in the TMA analyses, we additionally performed separate analyses in OPSCC positive for the HPV surrogate marker p16 (p16+ OPSCC) and in a pooled cohort consisting of p16-negative (p16-) OPSCC plus all laryngeal, hypopharyngeal and oral cavity carcinomas, in which HPV-driven cases are known to constitute only a minor fraction of less than 5% when assessing HPV E6/E7 mRNA in addition to p16 and/or HPV DNA (Castellsague et al. 2016; Taberna et al. 2016; Wittekindt et al. 2017; Tagliabue et al. 2020; Nauta et al. 2021; Simcoens et al. 2021). Again, the analyses revealed no clear associations (Supplementary Fig. 2).

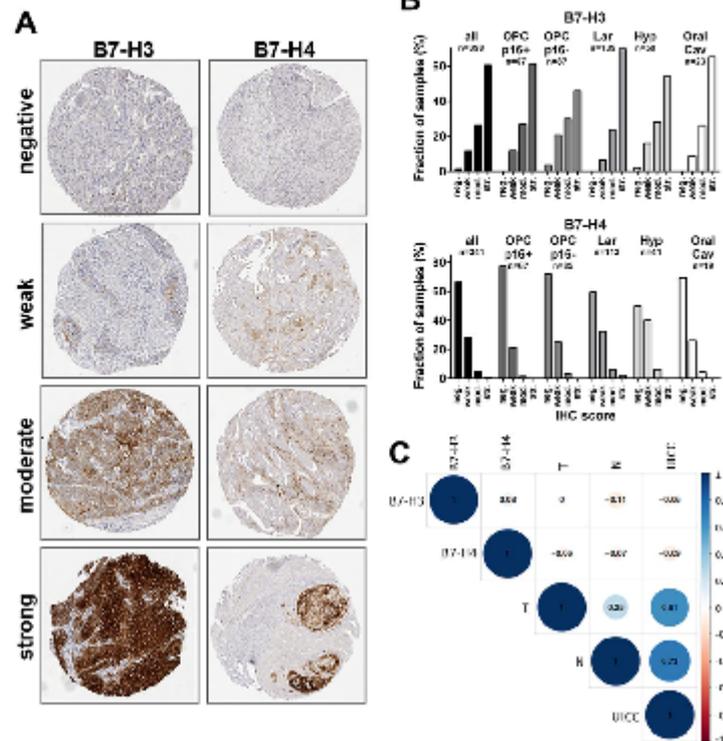
Associations of B7-H3 and B7-H4 protein expression levels and patient survival

To address the impact of B7-H3 and B7-H4 protein expression on patient survival, we dichotomized the staining scores according to the most abundant categories, which means *strong vs. all others* for B7-H3 and *negative vs. all others* for B7-H4.

In case of B7-H3, no significant association of protein expression and overall survival (OS) was observed for the whole cohort (Fig. 3A). In separate analyses for p16+ OPSCC and the above-described pooled cohort of largely HPV-negative tumors (in the following referred to as HPV-negative (HPV-) HNSCC), we observed a clear difference for the impact of B7-H3 regarding OS. In patients with p16+ OPSCC, those with tumors demonstrating strong B7-H3 expression showed a trend towards inferior survival but the difference did not reach significance (Fig. 3B). In contrast, patients with HPV- HNSCC showing strong B7-H3 expression demonstrated significantly favorable OS ($p=0.019$) (Fig. 3C). When looking at the individual sublocations of the pooled HPV- cohort, significantly better OS was observed for p16- OPSCC ($p=0.038$) (Fig. 3D) and a trend was observed in laryngeal SCC but not in hypopharyngeal tumors or in the rather few cases of oral cavity tumors in our cohort (Supplementary Fig. 3A). Regarding the interplay of B7-H3 expression and patient treatment, significantly favorable survival upon strong staining was observed after primary (chemo)radiation (RT/RCT) in the whole HPV-cohort ($p=0.023$) (Fig. 3E), which was largely based on profound differences in laryngeal tumors and p16- OPSCC (Supplementary Fig. 3B). It has to be mentioned, however, that the limited numbers of patients treated with primary RT/RCT in these two subgroups urge caution in the interpretation of the data and confirmatory studies are required. Regarding RFS after primary RT/RCT, we observed trends towards favorable outcome in patients with HPV- HNSCC and p16- OPSCC and a significant difference in laryngeal SCC (Supplementary Fig. 4).

For B7-H4 we also dichotomized the staining scores according to the most abundant category, which in this case

Fig. 2 Immunohistochemical staining and correlation analysis of B7-H3 and B7-H4. **A** Staining examples. **B** Distribution of staining categories in all HNSCC and the indicated main sublocations. neg.: negative; mod.: moderate; str.: strong. **C** Whole cohort correlation analysis does not demonstrate an association of protein expression with each other, T- or N-stage. Correlation of T- & N- with UICC-stage (7th edition) serves as an internal control



means *negative vs. all others*. We did not observe statistically different OS in dependence of absence or presence of B7-H4 staining but trends towards inferior survival upon expression in p16+OPSCC and the biggest treatment group of these tumors, namely patients receiving surgery and adjuvant RT/RCT (Fig. 4). Further and bigger cohorts of p16+OPSCC will be necessary to clarify whether and to what extent B7-H4 expression may represent a prognostic marker in these tumors.

Multivariable analyses

In a multivariable analysis including expression score, T- and N-stage, sex, and age, significance for strong B7-H3 expression in HPV-negative HNSCC was missed (HR 0.70, $p=0.10094$) (Table 2). In line with a faint negative association of B7-H3 expression with N- but not T-stage (Supplementary Fig. 2), significance was only retained when N-stage was omitted from the multivariable analyses (not shown). For p16-negative OPSCC, the sublocation demonstrating

the strongest prognostic impact of B7-H3, significance was retained in the multivariable analysis also when N-status was included (HR 0.3586, $p=0.0303$) (Table 2).

Discussion

The prognostic and predictive significance of the B7 immunoglobulin family members B7-H3 and B7-H4 is considerably less characterized compared to the well-known family members PD-L1 and PD-L2. For PD-L1, a recent meta-analysis reports favorable survival especially in patients with HPV+OPSCC showing high PD-L1 expression also under non-immunotherapy treatment (Polesel et al. 2021). This demonstrates that factors with clearly established roles in immunosuppression can serve as positive prognostic markers under standard regimes outside the context of immunotherapy. For B7-H3 and B7-H4, the counter-receptors for both proteins so far remain elusive, which clearly limits the clarification of their exact molecular functions. B7-H3 was

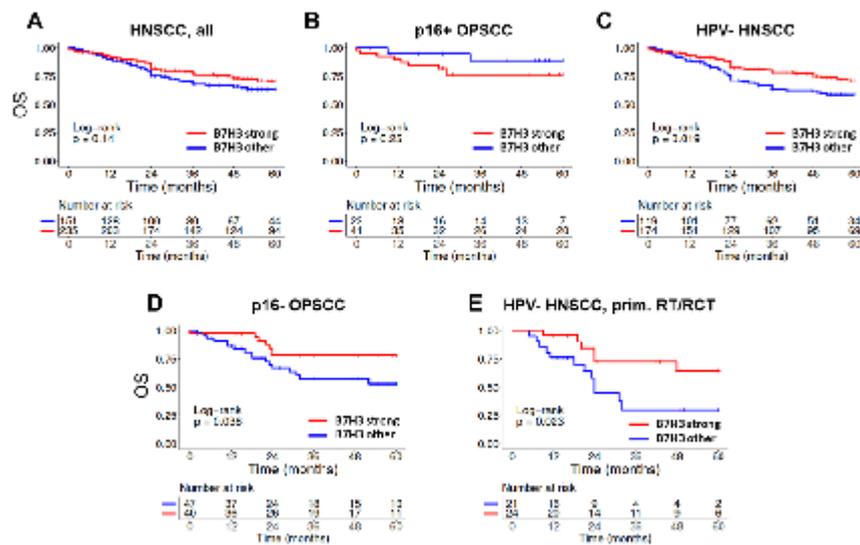


Fig. 3 Association of patient overall survival and B7-H3 expression. B7-H3 expression was categorized as either strong or other, which includes all samples scored as negative, weak or moderate. **A** All patients. **B** Patients with p16+OPSCC. **C** Patients with

HPV- HNSCC and **D** the subtraction of patients with p16- OPSCC. **E** Patients with HPV- HNSCC treated with primary radio(chemo) therapy

originally described as an immune stimulatory molecule and has been implicated in autoimmune diseases (Chapoval et al. 2001; Luo et al. 2004; Chen et al. 2020). In contrast, recent studies report a role as an immune checkpoint molecule, amongst other functions limiting anti-tumor responses through T- and NK-cells, but also the promotion of non-immunological protumorigenic functions has been reported, such as migration and invasion, angiogenesis or chemoresistance, and effects on tumor metabolism (Kontos et al. 2021; Zhou and Jin 2021).

B7-H3 was reported to be strongly expressed at the tumor cell surface in many cancer entities, as compared to only weak expression in normal tissues. Therefore, B7-H3 was referred to as a pan-cancer antigen, and various preclinical studies and clinical trials have been and are being conducted to exploit B7-H3 as a tumor specific therapeutic target, for example for bispecific antibodies (anti-CD3 x anti-B7-H3) linking immune cells to tumor cells, or for CAR-T cells (Yang et al. 2020; Kontos et al. 2021; Zhou and Jin 2021). A role as target in immune checkpoint inhibition, alone or combined with targeting of the PD1/PD-L1 axis, is also emerging in HNSCC. In this case, immune checkpoint blockade through B7-H3 inhibition as well as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) due to high amounts of antibodies binding to tumor cells with strong B7-H3 expression may

both contribute to a meaningful antitumor effect (Aggarwal et al. 2022).

Regarding its prognostic significance in HNSCC, it was mainly observed that B7-H3 is associated with inferior survival and a more advanced stage. However, data for both B7-H3 and even more for B7-H4 are rather sparse. Concerning the expression of B7-H4, our data did not confirm a negative prognostic value in HPV- HNSCC but show a trend toward inferior prognosis in HPV+OPSCC. However, significance was not reached in our limited cohort and further, and at best larger, p16+OPSCC cohorts will be necessary to address this issue. For B7-H3, our TMA data clearly confirm high expression in HNSCC tumors, in agreement with previous studies (Hu et al. 2019), with overall slightly more than 60% of samples categorized as *strong*, while mostly *weak* or *absent* staining was observed in the normal tissue control spots (Fig. 2B, Supplementary Fig. 1). However, we did not observe an association of B7-H3 expression with advanced tumor stages or inferior outcome but surprisingly, even observed moderately favorable survival in patients with HPV- disease, whose tumors showed *strong* staining (Fig. 3). Multivariable analyses suggest that this favorable survival may be related to a reduced lymph node involvement and that the most robust prognostic impact may exist for p16-OPSCC. In contrast, we did not observe any clear difference

Fig. 4 Association of patient overall survival and B7-H4 expression. B7-H4 expression was categorized as either negative or other, which includes all samples showing any kind of B7-H4 staining. **A** All patients. **B** Patients with HPV- OPSCC. **C** Patients with p16+ OPSCC and **D** patients with p16+ OPSCC treated with surgery and adj. RT/RCT

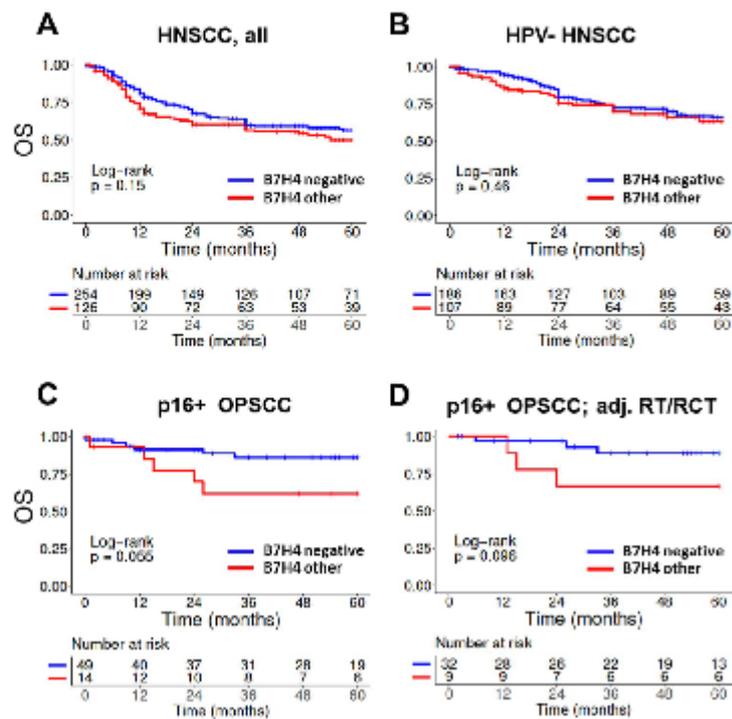


Table 2 Multivariable analyses

Variables	HR	95% CI	<i>p</i> -value
HPV- HNSCC			
B7-H3	0.700	0.457–1.072	0.10094
T-stage	1.411	1.145–1.740	** 0.00124
N-stage	1.361	1.079–1.716	** 0.00920
Age	1.469	1.161–1.857	** 0.00134
Sex (m,f)	0.834	0.497–1.402	0.49466
p16+ OPSCC			
B7-H3	0.3586	0.142–0.907	* 0.0303
T-stage	1.543	1.045–2.279	* 0.0293
N-stage	1.577	1.007–2.470	* 0.0465
Age	1.264	0.832–1.920	0.2731
Sex (m,f)	1.368	0.590–3.169	0.4652

Asterisks indicate significant associations of variables and survival, with * and ** indicating $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Cox proportional hazards regression). The table includes all tested variables of the respective analyses

regarding patient survival in the HPV- HNSCC sub-cohort in the TCGA dataset based on mRNA expression (Fig. 1). Various explanations for this discrepancy are possible. First, protein levels can be regulated post-transcriptionally and therefore differ from mRNA expression levels. The cutoffs used in both methods are different comparing the upper and lower quartiles, which can be applied independently of the absolute expression levels, in the mRNA analysis versus an immunohistochemistry score in which more than 50% of tumor samples were scored as *strong*. Of note, separation by the median mRNA expression level, which in this comparison may closer resemble the TMA scoring, did not yield more similar results (not shown). A potential disadvantage of IHC analyses is the dependence on the utilized antibodies but especially since the B7-H3 antibody used here is a clone whose specificity had been tested via knockout experiments, we are very confident regarding the quality of our staining. Lastly, the TCGA cohort contains less oropharyngeal and more oral cavity tumors than our TMA cohort and the impact in specific subgroups should clearly be further investigated but requires rather large cohorts. Another important parameter when assessing patient outcome is the type of

treatment delivered to the patients. Unfortunately, this information was mostly not provided in previous reports (Katayama et al. 2011; Hu et al. 2019). In a study by Li et al. the inferior outcome of LSCC patients with high B7-H3 expression was observed in a cohort of primarily operated patients (Li et al. 2021). Our results now suggest favorable survival of patients with HPV- tumors showing strong expression, especially when treated with definitive radio(chemo)therapy. However, due to the small numbers of patients and events in such specific subfractions, further analyses in other and, at best, larger cohorts are needed. Whether, and if so to what extent, immune modulatory or immune-independent functions of B7-H3 may contribute to a given enhanced radio(chemo)sensitivity of HPV- HNSCC with strong B7-H3 expression and whether this needs to be considered for potential combination therapy with anti-B7-H3 antibodies is an important question for future research.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04244-2>.

Acknowledgements Clinical data were in part obtained from the Clinical Cancer Registry of the University Cancer Center Hamburg (UCCH). We thank Gerhard Schön from the Institute of Medical Biometry and Epidemiology of the UKE for his advice on statistical analyses.

Author contributions CMK, MW, TMA construction and staining; CMB, TSC, TMA scoring; MB, NM, TSC, AM, TR: work up of clinical data; MB, AO, FM, CD, KB, TR: data analysis; CB, AM, TR: concept; KR, TSC, TR: supervision; MB, AO, KB, TR: writing.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported by a grant from the Hamburger Krebsgesellschaft (AM, TSC, TR) and by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF grant 02NUK032; KB, KR, TR).

Declarations

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

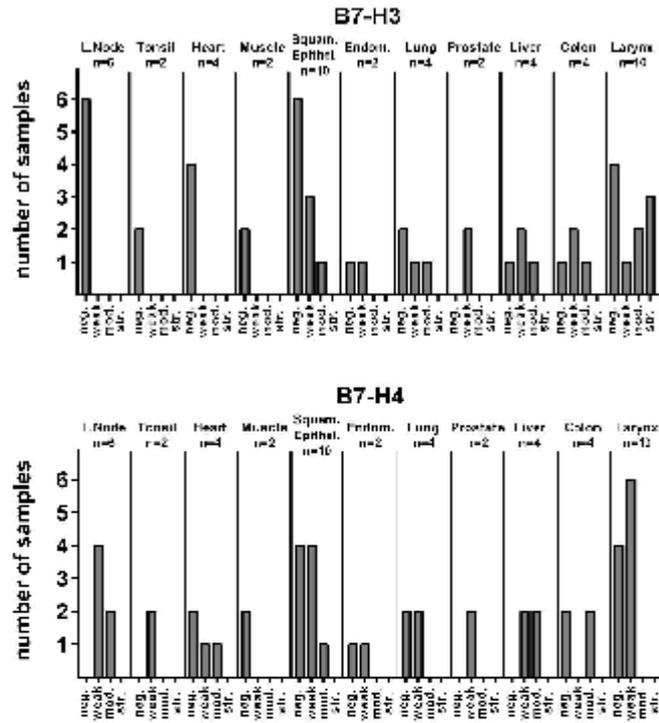
- Aggarwal C, Prawira A, Antonia S, Rahma O, Tolcher A, Cohen RB, Lou Y, Hauke R, Vogelzang D, P.Z., N et al (2022) Dual checkpoint targeting of B7-H3 and PD-1 with enoblituzumab and pembrolizumab in advanced solid tumors: interim results from a multicenter phase III trial. *J Immunother Cancer*. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004424>
- Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1999) Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughput fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 59:803–806
- Burtess B, Harrington KJ, Greil R, Soulieres D, Tahara M, De Castro G, Jr., Psyrri A., Basie, N., Neupane, P., Bratland, A., et al (2019) Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 394:1915–1928. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32591-7)
- Castellsague X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quiros B, Tous S, Clavero O, Alos L, Biegner T, Szafarowski T et al (2016) HPV involvement in head and neck cancers: comprehensive assessment of biomarkers in 3680 patients. *J Natl Cancer Inst*. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv403>
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML., Larsson E et al (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multi-dimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2:401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
- Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, Dong H, Sica GL, Zhu G, Tamada K et al (2001) B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2:269–274. <https://doi.org/10.1038/85339>
- Chen L, Jin M, Li C, Shang Y, Zhang Q (2017) The tissue distribution and significance of B7-H4 in laryngeal carcinoma. *Oncotarget* 8:9227–9229. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21152>
- Chen Y, Guan SY, Deng J, Yang H, Xu W, Xu S, Shao M, Gao X, Xu S, Shuai Z et al (2020) B7-H3: a promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Cell Immunol* 352:104077. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104077>
- Cohen N, Fedewa S, Chen AY (2018) Epidemiology and demographics of the head and neck cancer population. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 30:381–395. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.06.001>
- Dancu AM, Simon R, Mirlacher M, Sauter G (2016) Tissue microarrays. *Methods Mol Biol* 1381:53–65. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3204-7_3
- Ding S, Lv X, Liu Z, Zhan S, Xu Y, Zhang X, Liu C, Cao L (2021) Overexpression of B7-H4 is associated with infiltrating immune cells and poor prognosis in metastatic colorectal cancer. *Int Immunopharmacol* 90:107144. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107144>
- Du E, Mazul AL, Farquhar D, Brennan P, Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, Weissler MC, Hayes DN, Olishan AF, Zevallos JP (2019) Long-term survival in head and neck cancer: impact of site, stage, smoking, and human papillomavirus status. *Laryngoscope* 129:2506–2513. <https://doi.org/10.1002/lary.27807>
- Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington KJ, Kasper S, Vokes EE, Even C et al (2018) 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* 81:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.04.008>

- Gao J, Aksoy BA, Dogrusuz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larson E et al (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
- Hu J, Jiang C, Zheng M, Guo Y, Tang X, Ren J, Lu D, Yu L, Gan W, Liu S et al (2019) Overexpression of B7-H3 as an opportunity for targeted therapy in head and neck cancers. *Am J Transl Res* 11:5183–5196
- Huang SH, O'sullivan B (2017) Overview of the 8th edition TNM classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0484-y>
- Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, Bravo HC, Davis S, Gatto L, Girke T et al (2015) Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* 12:115–121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>
- Ingebrigtsen VA, Boye K, Tekle C, Nesland JM, Flatmark K, Fodstad O (2012) B7-H3 expression in colorectal cancer: nuclear localization strongly predicts poor outcome in colon cancer. *Int J Cancer* 131:2528–2536. <https://doi.org/10.1002/ijc.27566>
- Kassambara A., and Kosinski J. (2018). *survminer: Drawing Survival Curves using ggplot2*. R package version 0.4.3. <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
- Katayama A, Takahara M, Kishibe K, Nagato T, Kunibe I, Katada A, Hayashi T, Harabuchi Y (2011) Expression of B7-H3 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma as a predictive indicator for tumor metastasis and prognosis. *Int J Oncol* 38:1219–1226. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.949>
- Kontos F, Michelakos T, Kurokawa T, Sadagopan A, Schwab JH, Ferrone CR, Ferrone S (2021) B7-H3: an attractive target for antibody-based immunotherapy. *Clin Cancer Res* 27:1227–1235. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2584>
- Li Y, Cai Q, Shen X, Chen X, Guan Z (2021) Overexpression of B7-H3 is associated with poor prognosis in laryngeal cancer. *Front Oncol* 11:759528. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.759528>
- Li H, Yang Z, Yang X, Zhang F, Wang J, Wu Z, Wanyan C, Meng Q, Gao W, Yang X et al (2022) LINC01123 promotes immune escape by sponging miR-214-3p to regulate B7-H3 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Cell Death Dis* 13:109. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04542-0>
- Luo L, Chapoval AI, Flies DB, Zhu G, Hirano F, Wang S, Lau JS, Dong H, Tamada K, Flies AS et al (2004) B7-H3 enhances tumor immunity in vivo by costimulating rapid clonal expansion of antigen-specific CD8+ cytolytic T cells. *J Immunol* 173:5445–5450. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5445>
- Mami-Chouaib F, Blanc C, Cognac S, Hans S, Malenica I, Granier C, Tihy I, Tartour E (2018) Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. *J Immunother Cancer* 6:87. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0399-6>
- Meng Z, Wang F, Zhang Y, Li S, Wu H (2017) B7-H4 as an independent prognostic indicator of cancer patients: a meta-analysis. *Oncotarget* 8:68825–68836. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18566>
- Nauta-Heideman, D.a.M., Brink, A., Van Der Steen, B., Bloemena, E., Koljenovic, S., Baakenburg De Jong, R.J., Leemans, C.R., and Brakenhoff, R.H. IH (2021) The unveiled reality of human papillomavirus as risk factor for oral cavity squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 149:420–430. <https://doi.org/10.1002/ijc.33514>
- Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc.3239>
- Polesel J, Menegaldo A, Tirelli G, Giacomarà V, Guerrieri R, Baboci L, Casarotto M, Lupato V, Fanetti G, Boscolo-Rizzo P et al (2021) Prognostic Significance of PD-L1 Expression In Patients with primary oropharyngeal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Front Oncol* 11:787864. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.787864>
- Robert C (2020) A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat Commun* 11:3801. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17670-y>
- Simoes C, Gorbacheva I, Gheit T, Holzinger D, Lucas E, Ridder R, Rehm S, Vermeulen P, Lammens M, Vanderveken OM et al (2021) HPV DNA genotyping, HPV E6*1 mRNA detection, and p16(INK4a)/Ki-67 staining in Belgian head and neck cancer patient specimens, collected within the HPV-AHEAD study. *Cancer Epidemiol* 72:101925. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2021.101925>
- Simon R, Mirlacher M, Sauter G (2010) Immunohistochemical analysis of tissue microarrays. *Methods Mol Biol* 664:113–126. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-806-5_12
- St Paul M, Ohashi PS (2020) The roles of CD8(+) T cell subsets in antitumor immunity. *Trends Cell Biol* 30:695–704. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.003>
- Steuer S, Schneider J, Buschek F, Luebke AM, Kluth M, Hube-Magg C, Hinsch A, Hoffmayer D, Weidemann S, Praune C et al (2021) Immunohistochemically detectable thyroglobulin expression in extrathyroidal cancer is 100% specific for thyroidal tumor origin. *Ann Diagn Pathol* 54:151793. <https://doi.org/10.1016/j.amdiagpath.2021.151793>
- Taberna M, Resteghini C, Swanson B, Pickard RK, Jiang B, Xiao W, Mena M, Kreinbrink P, Chio E, Gillison ML (2016) Low etiologic fraction for human papillomavirus in larynx squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 61:55–61. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.08.009>
- Tagliabue M, Mena M, Maffini F, Gheit T, Quiros Blasco B, Holzinger D, Tous S, Scelsi D, Riva D, Grosso E et al (2020) Role of human papillomavirus infection in head and neck cancer in Italy: The HPV-AHEAD Study. *Cancers (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/cancers12123567>
- Therneau TM, Grambsch PM (2000) *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer, New York
- Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ (2020) A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 20:651–668. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
- Wang C, Li Y, Jia L, Kim JK, Li J, Deng P, Zhang W, Krebsbach PH, Wang CY (2021) CD276 expression enables squamous cell carcinoma stem cells to evade immune surveillance. *Cell Stem Cell* 28(1597–1613):e1597. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.04.011>
- Wei, T., and Simko, V. (2017). R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version .84). <https://github.com/taiyun/corrplot>
- Wickham, H. (2007). *Reshaping Data with the reshape Package*. *Journal of Statistical Software* 21(12), 1–20. <http://www.jstatsoft.org/v21/i12/>
- Wittekindt C, Wuerdemann N, Gattenlohner S, Brobeil A, Wierzbicka M, Wagner S, Klussmann JP (2017) The role of high-risk human papillomavirus infections in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 274:3837–3842. <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4718-1>
- Wu L, Deng WW, Yu GT, Mao L, Bu LL, Ma SR, Liu B, Zhang WF, Sun ZJ (2016) B7-H4 expression indicates poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 65:1035–1045. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1867-9>
- Xu H, Chen X, Tao M, Chen K, Chen C, Xu G, Li W, Yuan S, Mao Y (2016) B7-H3 and B7-H4 are independent predictors of a poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Oncol Lett* 11:1841–1846. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4128>
- Yang S, Wei W, Zhao Q (2020) B7-H3, a checkpoint molecule, as a target for cancer immunotherapy. *Int J Biol Sci* 16:1767–1773. <https://doi.org/10.7150/ijbs.41105>
- Zheng Y, Liao N, Wu Y, Gao J, Li Z, Liu W, Wang Y, Li M, Li X, Chen L et al (2019) High expression of B7H2 or B7H3 is associated

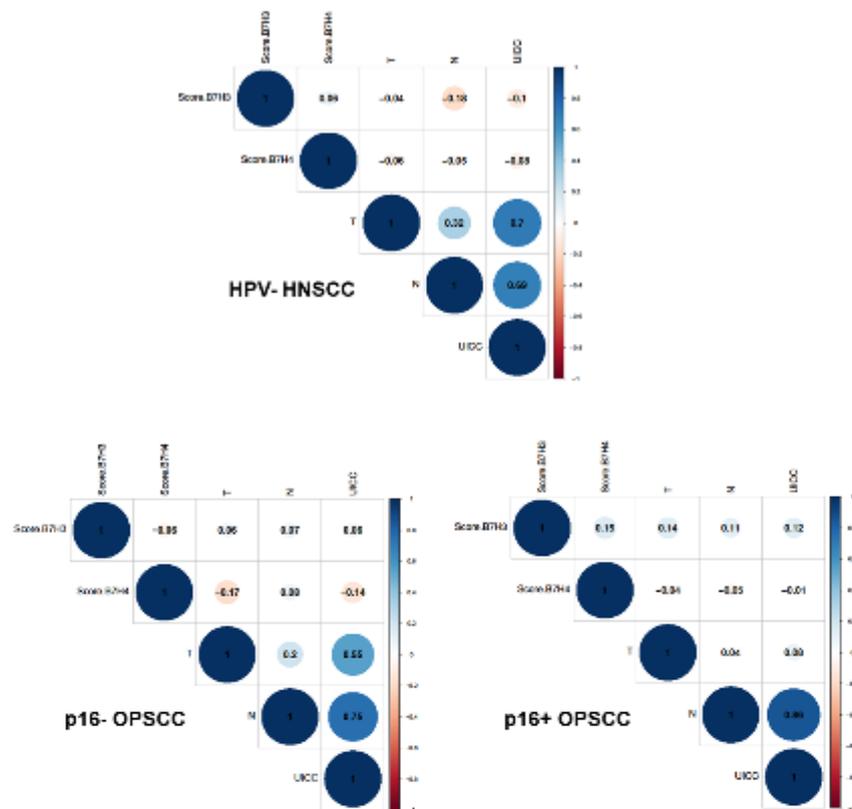
- with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 19:4315–4325. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10080>
- Zhou WT, Jin WL (2021) B7-H3/CD276: an emerging cancer immunotherapy. *Front Immunol* 12:701006. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.701006>
- Zhuang RY, Xu HG (2020) Head and neck cancer. *N Engl J Med* 382:e57. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001370>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

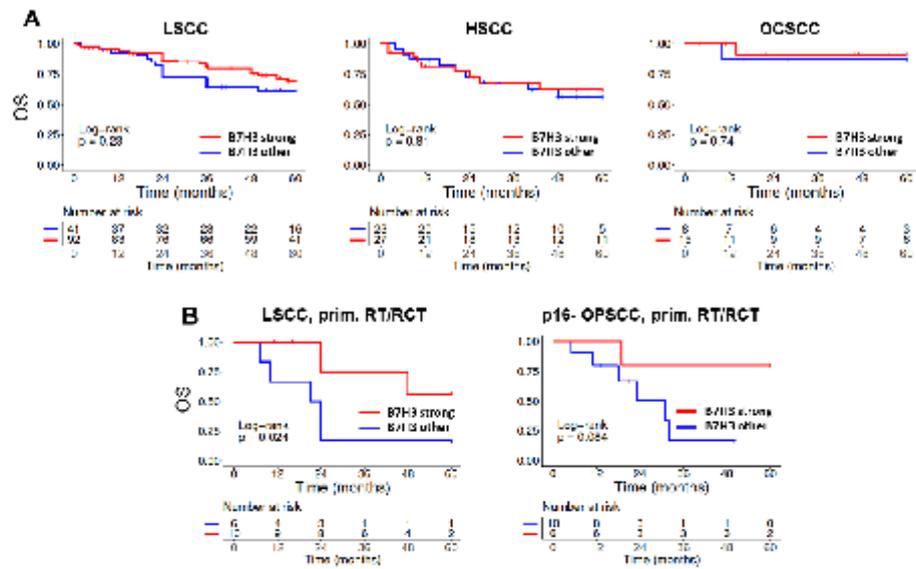
Supplementary Figures



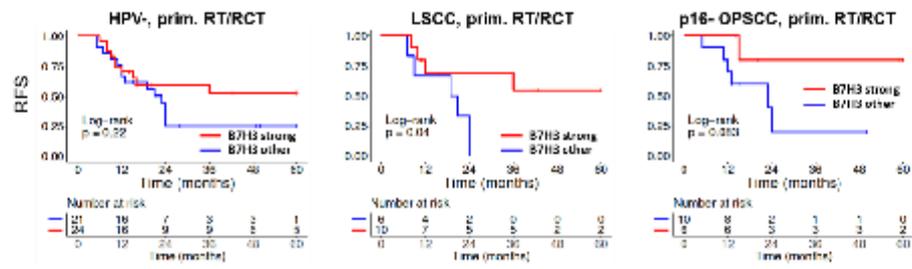
Supplementary Figure 1. Immunohistochemical staining of normal tissue control samples. Distribution of staining categories in the normal tissue control samples of the TMA in absolute numbers. Staining of normal tissue for B7-H3 is clearly reduced as compared to the HNSCC tumor samples. Note that the mostly small number of samples per tissue type limits accurate conclusions. neg.: negative; mod.: moderate; str.: strong; Squam. Epithel.: Squamous epithelium; Endom.: Endometrium



Supplementary Figure 2. Correlation analyses. Correlation analyses of B7-H3 and B7-H4 expression scores with each other and with T-, N- and UICC-stage (7th edition) in HPV- HNSCC and in OPSCC in dependence of the p16 status. As expected, T and N-stage show a clear correlation with UICC-stage (7th edition) in HPV- HNSCC and p16- OPSCC and N-stage with UICC-stage in p16+ OPSCC. B7-H3 and B7-H4 do not demonstrate a clear correlation with each other or T-, or N-stage. Note that faint associations are observed between B7-H3 and N-status in HPV- HNSCC and B7-H4 and T-status in p16- OPSCC.



Supplementary Figure 3. Association of overall survival and B7-H3 expression in the indicated subgroups. B7-H3 expression was categorized as either strong or other, which includes all samples scored as negative, weak or moderate.



Supplementary Figure 4. Association of recurrence free survival and B7-H3 expression in the indicated patients groups treated with primary RT/RCT. B7-H3 expression was categorized as either strong or other, which includes all samples scored as negative, weak or moderate.

2. Darstellung der Publikation

2.1 Titel

“The prognostic impact of B7-H3 and B7-H4 in head and neck squamous cell carcinoma”

2.2 Einfache Zusammenfassung

In Hinblick auf neue therapeutische Ansätze im Bereich der Krebstherapie steht eine gezielte Hemmung von Immun-Checkpoints immer mehr im Fokus der Forschung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die prognostische Bedeutung der Proteine der B7-Superfamilie B7-H3 und B7-H4 bei Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses (HNSCC) untersucht. Proteine der B7-Immunglobulin-Superfamilie fungieren sowohl als Immunstimulatoren als auch als Immun-Checkpoint-Rezeptoren, weshalb sie als Target im Rahmen einer Immun-Checkpoint-Blockierung dienen können.

Es konnte mit den vorliegenden Daten gezeigt werden, dass für B7-H3 eine hohe Expression in HNSCC-Tumoren vorliegt, sich hier jedoch keine Assoziation der Expression mit Tumorstadien oder Gesamtüberleben feststellen lässt. Es konnte allerdings ein mäßig günstigeres Überleben bei Patienten beobachtet werden, in deren Tumorgewebe mit erhöhter B7-H3-Expression kein HPV (Humanes Papillomavirus) -Nachweis erbracht werden konnte (HPV-). Da die Datenlage im Hinblick auf diese Ergebnisse noch spärlich ist, sollte die Bedeutung von B7-H3 als tumorspezifisches therapeutisches Ziel bei HNSCC noch weiter geklärt werden und eine Grundlage für zukünftige Studien darstellen.

Für B7-H4 konnte keine generell erhöhte Expression in HNSCC nachgewiesen werden; in dieser Arbeit konnte B7-H4 nicht als allgemeingültiger prognostischer Marker bei HPV-HNSCC bestätigt werden. Auffallend war jedoch, dass bei HPV-positiven (HPV+) Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx (OPSCC), einer Untergruppe der HNSCC, bei denen B7-H4 vermehrt exprimiert war, ein Trend zu einem schlechteren Gesamtüberleben beobachtet werden konnte.

2.3 Abstract

Eine wichtige therapeutische Option für viele Krebsarten ist heutzutage die Hemmung eines Immun-Checkpoints. Beim HNSCC ist die gezielte Beeinflussung der Immunantwort durch PD-1/PD-L1 (auch bekannt als B7-H1) bei rezidivierender oder metastasierter Erkrankung zugelassen und wird inzwischen auch als kurative Behandlungsoption als Erstlinientherapie in Studien getestet. In dieser Arbeit haben wir zwei verwandte Mitglieder der B7-Superfamilie, B7-H3 und B7-H4, auf ihre prognostische Bedeutung im Rahmen der Standardtherapien von

Kopf- und Halstumoren untersucht. Zu diesem Zweck haben wir einen Gewebe-Mikroarray (TMA) einer HNSCC-Kohorte aus einem einzigen Zentrum durch Gewebefärbung auf die Expression von B7-H3 und B7-H4 untersucht. Die Intensität der Färbung und die Anzahl der angefärbten Tumorzellen wurden beurteilt und die Expression nach einem etablierten Algorithmus bewertet. Die Scores der Farbintensitäten wurden mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert und mit dem Überleben der Patienten in Zusammenhang gestellt. Die mRNA-Konzentrationen der beiden Proteine wurden anhand des „Cancer Genome Atlas“ (TCGA) -Datensatzes mit dem klinischen Outcome der Patienten in Verbindung gebracht. Es zeigte sich, dass hohe mRNA-Spiegel von B7-H3 und B7-H4 nicht signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben in Verbindung gebracht werden konnten.

Bei der TMA-Analyse hingegen ergab sich, bei interpretierbaren Proteinfärbungen in 408 Proben, für B7-H3 vorherrschend eine *starke* Anfärbung; bei B7-H4 kam es vorherrschend zu keiner Färbung (*negativ*). Bei Patienten mit HPV- OPSCC und in einer gepoolten Kohorte, die aus HPV- OPSCC, Larynx- (LSCC), Hypopharynx HSCC- und Mundhöhlen- OSCC Plattenepithelkarzinomen bestand, war eine starke B7-H3-Expression mit einem besseren Gesamtüberleben verbunden. In der letztgenannten Kohorte war des Weiteren bei der Mehrzahl der Patienten ein geringerer Lymphknotenbefall zu beobachten; diese Tatsache könnte das oben genannte bessere Gesamtüberleben erklären. Die B7-H3-Expression bei HPV+ OPSCC und die B7-H4-Expression bei HNSCC korrelierten nicht mit dem klinischen Outcome.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass trotz einer möglichen Rolle von B7-H3 bei der Umgehung der Immunantwort, B7-H3 bei HPV-negativen HNSCC in unserer Kohorte mit einer günstigen Prognose einherging. Die zugrundeliegenden Mechanismen und die möglichen Erfolge einer gezielten Behandlung mit B7-H3 als Target müssen noch weiter geklärt werden.

2.4 Einleitung

Kopf-Halstumore zählen zu der sechsthäufigsten bösartigen Erkrankung des Menschen, wobei jährlich weltweit etwa 450.000 neue Fälle von HNSCC diagnostiziert werden (Cohen et al. 2018, Zhuang und Xu, 2020). Zum Zeitpunkt der Diagnose befinden sich die meisten Patienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Im Frühstadium der Erkrankung ist die Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit mit 75 bis 90 % günstig. Die meisten Patienten weisen jedoch ein lokal fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung mit einer Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 50 % auf (Du et al. 2019). Der Goldstandard der Behandlung ist die kurative Behandlung mittels Operation und/oder Bestrahlung mit gegebenenfalls kombinierter Chemotherapie. Die Wahl der Primärbehandlung hängt im

Wesentlichen mit der betroffenen Tumorlokalisierung und dem TNM-Stadium zusammen. In fortgeschrittenen Stadien ist eine multimodale Behandlung üblich. Wichtige anerkannte prognostische Biomarker sind der Nachweis von HPV bzw. des Surrogatmarkers p-16 bei OPSCC, die eine ausgesprochen günstige Prognose aufweisen, was nach deren Entdeckung zu einer Anpassung der TNM-Klassifikation geführt hat (Huang und O'Sullivan 2017).

Ein vielversprechender Weg zur Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit bei HNSCC, wie auch bei vielen anderen Tumorentitäten, ist die Blockierung von Immun-Checkpoint-Rezeptoren (Robert 2020). Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass T-Lymphozyten als Teil des adaptiven Immunsystems eine zentrale Rolle bei der Anti-Tumor-Immunität spielen (Mami-Chouaib et al. 2018, St Paul und Ohashi 2020, Waldman et al. 2020). Der Aktivitätsstatus von T-Lymphozyten sowie anderen Immunzellen, wie tumorassoziierten Makrophagen und natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen), wird durch eine Vielzahl immunmodulierender Rezeptoren reguliert, darunter Immun-Checkpoint-Rezeptoren, die eine entscheidende Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber normalem Gewebe spielen. Die B7-Immunglobulin-Superfamilie umfasst sowohl Immunstimulatoren als auch potente Immun-Checkpoint-Rezeptoren, darunter die in vergangenen Studien häufig untersuchten Vertreter PD-L1 und PD-L2 (auch bekannt als B7-H1 bzw. B7-DC) (Pardoll 2012). Es hat sich gezeigt, dass die Hemmung der PD-1/PD-L1-Achse mit sowie ohne Chemotherapie das Gesamtüberleben (OS) bei der Erstlinienbehandlung von PD-L1-exprimierenden rezidivierten oder metastasierten HNSCC im Vergleich zum EXTREME-Schema (Chemotherapie mit Cisplatin bzw. Carboplatin und 5-FU plus Cetuximab) verbessert (Burtness et al. 2019). Trotz dieser jüngsten Fortschritte sind die Ansprechraten auf die Immun-Checkpoint-Inhibition bei HNSCC jedoch alles andere als zufriedenstellend (Ferris et al. 2018, Burtness et al. 2019).

Weitere immuninhibitorische Mitglieder der B7-Superfamilie, die ähnlich wie PD-L1 auf der Oberfläche einer Vielzahl von normalen Geweben, aber auch von Tumorzellen exprimiert werden, sind B7-H3 (auch bekannt als CD276) und B7-H4 (auch bekannt als VCTN1). Im onkologischen Kontext wurde eine hohe Expression von B7-H3 bei verschiedenen Krebsarten festgestellt, darunter Melanom, Gliom, Mamma- und Ovarialkarzinom, hepatozelluläres Karzinom, kolorektales Karzinom, Pankreaskarzinom und nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom. Eine hohe Expression von B7-H3 wurde außerdem wiederholt als negativer prognostischer Faktor beschrieben, beispielsweise bei Pankreas-, Kolon-, Mamma- und Ovarialkarzinom und hepatozellulärem Karzinom (Ingebrigtsen et al. 2012, Xu et al. 2016, Zheng et al. 2019). Es wurde berichtet, dass B7-H4 in verschiedenen Tumorarten wie Milz-, Thymus-, Mamma- und Ovarialkarzinom, Melanom, Magen- und Nierenzellkarzinom, nicht-

kleinzelligem Lungenkarzinom, Speiseröhren-, Endometrium-, Kolon- und Pankreaskarzinom exprimiert wird und in den meisten Fällen mit einem schlechteren klinischen Outcome in Verbindung gebracht wurde (Xu et al. 2016, Meng et al. 2017, Ding et al. 2021).

Bei HNSCC ist die Rolle beider Proteine für das Fortschreiten des Tumors und das Überleben der Patienten noch nicht abschließend geklärt. Katayama et al. untersuchten die Expression von B7-H3 in 37 Tumorproben von Patienten mit hypopharyngealem Plattenepithelkarzinomen (HSCC), die nach Primärtherapie anfänglich tumorfrei waren. Dabei wurde eine höhere Rate an späten Fernmetastasen bei Patienten beobachtet, deren Tumoren eine höhere B7-H3-Expression aufwiesen (Katayama et al. 2011). Hu et al. berichteten über eine hohe Expression von B7-H3 in 66,1 % der HNSCC-Proben und eine Korrelation mit einem schlechten Überleben in einer Kohorte von 274 Tumorproben (Hu et al. 2019). Li et al. berichteten in ähnlicher Weise über ein schlechteres Überleben bei hoher Expression von B7-H3 in einer Kohorte von 122 Patienten mit Larynxkarzinom (LSCC) (Li et al. 2021). Hohe Expressionswerte von B7-H3 wurden mit einer geringeren T-Zell-Infiltration in Verbindung gebracht (Katayama et al. 2011, Li et al. 2021). Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass die Expression von B7-H3 und die damit einhergehende Umgehung des Immunsystems bei HNSCC durch eine lange, nichtkodierende RNA (LINC01123) durch Unterdrückung der miRNA (miR-214-3p)-vermittelten Hemmung der B7-H3-Expression reguliert wird (Li et al. 2022) und dass insbesondere HNSCC-Krebsstammzellen (CSCs) B7-H3 nutzen, um sich der Immunregulation zu entziehen. Es wurde gezeigt, dass Anti-B7-H3-Antikörper solche CSCs in einem HNSCC-Mausmodell in Abhängigkeit von CD8⁺ T-Zellen eliminieren (Wang et al. 2021).

Für B7-H4 gibt es nur wenige Daten zu seiner potenziellen prognostischen Auswirkung bei HNSCC. Wu et al. berichteten, dass bei Tumoren der Mundhöhle (OSCC) die Expression von B7-H4 mit dem Lymphknotenstatus und der Tumorzelldifferenzierung (Grading) assoziiert war. Eine hohe Expression war mit einem schlechten Gesamtüberleben verbunden (Wu et al. 2016). Bei LSCC wurde eine Ko-Expression von B7-H4 mit Markern des epithelialen zu mesenchymalen Übergangs (EMT) beschrieben und eine Überexpression von B7-H4 induzierte deren Expression in LSCC-Zellen, was auf einen ursächlichen Zusammenhang schließen lässt (Chen et al. 2017).

2.5 Ziele und Hypothese

In Anbetracht der umfangreichen Datenlage zum prognostischen Potential der Proteine der B7-Superfamilie B7-H3 und B7-H4 in diversen anderen Tumorentitäten sowie generell der Hemmung von Immun-Checkpoints in der Krebstherapie bei Kopf-Hals-Tumoren als immer mehr an Bedeutung gewinnende Therapieoption, setzt sich diese Arbeit zum Ziel, das

Expressionsmuster sowie die potentielle Auswirkungen beider Marker auf das Gesamt- sowie das rezidivfreie Überleben der Patienten in einer Patientenkohorte bei HNSCC retrospektiv zu untersuchen. Wir nahmen an, dass, auch bei HNSCC eine erhöhte Expression von B7-H3 und B7-H4 mit einem schlechteren Gesamtüberleben und einem fortgeschrittenerem Tumorstadium einherginge. Als immunregulatorische Faktoren könnten beide Proteine auch bei HNSCC sinnvolle Ansatzpunkte für die Hemmung von Immun-Checkpoints als Alternative zu oder in Kombination mit den derzeitigen Immuntherapieansätzen dienen. In den wenigen bisher durchgeführten Studien zu B7-H3 und B7-H4 in HNSCC wurden allerdings bislang in erster Linie kleine Patientenkohorten mit Blick auf anatomische Unterregionen im Kopf- Halsbereich untersucht. Die vorliegende Arbeit soll nun eine umfangreiche Übersicht über die Expressionsmuster sowie die prognostischen Bedeutungen von B7-H3 und B7-H4 im gesamten Gebiet der Kopf- und Halstumoren bieten. Zudem interessierte uns eine mögliche prognostische Bedeutung der gleichzeitigen Expression beider Proteine in den untersuchten Tumoren.

2.6 Material und Methoden

Klinische In-silico-Analyse

Klinische und mRNA-Expressionsdaten für B7-H3 oder B7-H4 wurden aus der HNSCC TCGA-Kohorte des cBioPortals (<http://cbioportal.org>) extrahiert (Cerami et al. 2012, Gao et al. 2013). Für jeden Tumor (n= 516) wurde die B7-H3- oder B7-H4-Genexpression analysiert, und die 25 % der Tumoren mit der jeweils höchsten und der niedrigsten Genexpression im Hinblick auf das Gesamtüberleben der Patienten verglichen. p-Werte wurden mithilfe des log-rank-Testes berechnet.

Probensammlung und TMA-Konstruktion

Das Überleben und die klinisch-pathologischen Daten von HNSCC-Patienten, die mit kurativem Therapieansatz am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf behandelt wurden, wurden retrospektiv analysiert. Die Tumoren wurden zwischen 1992 und 2013 diagnostiziert, wobei die überwiegende Mehrheit von 95 % zwischen 2000 und 2013 diagnostiziert wurde. Die Gewebeproben wurden entweder aus Primärtumoren während der chirurgischen Resektion oder aus diagnostischen Biopsien gewonnen. Die Verwendung von archivierten diagnostischen Geweberesten und deren Analyse zu Forschungszwecken sowie die Analyse von Patientendaten wurden durch die lokalen Gesetze (HmbKHG, §12,1) und die lokale Ethikkommission (Ethikkommission Hamburg, WF-049/09) genehmigt. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Die Gewebeprobe für die TMA-Konstruktion, wurden in gepuffertem 4% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die TMA-Konstruktion wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Bubendorf et al. 1999, Dancau et al. 2016).

Zusammenfassend wurden von jedem ausgewählten Primärtumorblock Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte angefertigt, um repräsentative Tumorregionen zu identifizieren. Aus jedem Block wurde ein Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 0,6 mm mit einem selbstgebauten halbautomatischen Gewebearrayer gestanzt. Für die immunhistochemische Färbung wurden mit dem Paraffin-Sectioning-Aid-System (Instrumentics, Hackensack, NJ, USA) 3-Mikrometer große TMA-Schnitte angefertigt.

Immunhistochemie

Die frisch geschnittenen TMA-Schnitte wurden in einem einzigen Versuch an einem Tag analysiert. Nach einer 10-minütigen Peroxidase-Blockierung mit H₂O₂ (DAKO S2023) wurden B7-H3 (monoklonaler Kaninchen-Antikörper; Klon SP265; Zytomed) und B7-H4 (monoklonaler Maus-Antikörper, Klon H74; Antibodies Online) als Antikörper für die immunhistochemische Färbung verwendet. Die Objektträger wurden in einem Autoklaven in Zitratpuffer, pH 7,8, 5 Minuten lang bei hoher Temperatur vorbehandelt. Das Envision-System (DAKO 5007) wurde zur Visualisierung der Immunfärbung verwendet. Die Färbung wurde von zwei erfahrenen Pathologen (TSC & CMvB) anhand eines etablierten Systems bewertet, das auf der Intensität der Färbung (0, 1, 2, 3 - bezogen auf fehlende, geringe, mittlere oder hohe Intensität) und dem Anteil der gefärbten Tumorzellen basiert (Simon et al. 2010, Steurer et al. 2021). Der endgültige immunhistochemische Score (IHC-Score) (*negativ, schwach, mäßig, stark*) wird wie folgt aus diesen Parametern gebildet: *Negative* Scores hatten eine Färbeintensität von 0; *schwache* Scores hatten eine Färbeintensität von 1+ in ≤70% der Tumorzellen oder eine Färbeintensität von 2+ in ≤30% der Tumorzellen; *mäßige* Werte hatten eine Färbeintensität von 1+ bei >70% der Tumorzellen, eine Färbeintensität von 2+ bei >30% und ≤70% der Tumorzellen oder eine Färbeintensität von 3 bei ≤30% der Tumorzellen; und *starke* Werte eine Färbeintensität von 2+ bei >70% der Tumorzellen oder eine Färbeintensität von 3 bei >30% der Tumorzellen. Bei Unstimmigkeiten wurden die Gewebestellen von beiden Pathologen erneut analysiert und ein Konsensergebnis ermittelt.

Analyse des Patientenüberlebens

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von R und der Bioconductor-Umgebung (Huber et al. 2015) zur Datenverarbeitung, -analyse und -auswertung durchgeführt. Überlebensanalysen wurden nach der Kaplan-Meier-Methode und dem Log-rank-Test mit den R-Paketen "survival"

und "survminer" durchgeführt, multivariante Analysen wurden mit einem Cox-Proportional-Hazards-Regressionsmodell unter Verwendung des "survival"-Pakets (Therneau und Grambsch 2000, Kassambara und Kosinski 2018) durchgeführt. Potenzielle Assoziationen zwischen Variablen wurden mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten getestet (R-Pakete: reshape und corplot, (Wickham and Reshaping Data with the reshape Package. Journal of Statistical Software 2007, Wei und Simko 2017). Alle statistischen Analysen sind als explorativ zu betrachten. Die angegebenen p-Werte sind zweiseitig und werden nur als deskriptive Maße verwendet.

Weitere Datenanalysen

Die Darstellung der Proteinexpressionswerte wurde mit GraphPad Prism 6 durchgeführt.

2.7 Ergebnisse

Hohe mRNA-Expression von B7-H3 ist kein negativer prognostischer Marker für das Gesamtüberleben

Um die Auswirkungen der mRNA-Expression von B7-H3 und B7-H4 in Tumorzellen auf das Überleben bei HNSCC zu untersuchen, wurde die Expression beider Marker anhand des TCGA-Datensatzes (cBioportal.com) analysiert. Eine hohe mRNA-Expression von B7-H3 zeigte einen Trend zu einer negativen prognostischen Auswirkung auf das OS in der gesamten Kohorte, aber der Unterschied erreichte keine Signifikanz ($p=0,06$) (s. Publikation, Abb. 1A oben). Für die mRNA-Expression von B7-H4 konnte kein Zusammenhang oder Trend festgestellt werden ($p=0,9$) (s. Publikation, Abb. 1A unten). Aufgrund der unterschiedlichen pathologischen Mechanismen in Zellen von HPV+ HNSCC wurden daraufhin alle HPV+-Proben und die wenigen OPSCC mit unbekanntem HPV-Status aus der Analyse ausgeschlossen. In den verbleibenden HPV- Tumoren (s. Publikation, Abb. 1B) und in einer Kohorte, die nur aus HPV+ OPSCC bestand, wurden keine eindeutigen Unterschiede festgestellt, obwohl die letztgenannten Ergebnisse aufgrund der geringen Anzahl von Fällen und Ereignissen mit Vorsicht zu interpretieren sind (s. Publikation, Abb. 1C).

Es zeigt sich eine hohe B7-H3- und eine niedrige B7-H4-Proteinexpression bei HNSCC

Um den Einfluss der B7-H3- und B7-H4-Proteinexpression auf das Überleben von Patienten mit HNSCC weiter zu beurteilen, wurde die Expression beider Proteine in einer retrospektiven Kohorte in einem TMA-Format analysiert. Alle Patienten, deren Proben in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden in kurativer Absicht am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf behandelt. Insgesamt zeigten 398 bzw. 395 Proben eine interpretierbare Färbung für B7-H3

bzw. B7-H4. Das OPSCC war mit 185 Fällen am häufigsten vertreten, gefolgt von LSCC mit 140, HSCC mit 51 und OSCC mit 23 Fällen. Bezüglich der klinisch-pathologischen Merkmale nach der TNM-Klassifikation zeigten 112 Patienten einen T2-, 97 einen T1- bzw. T4- und 94 einen T3-Status. Bei 184 Patienten ergab sich ein N0-, bei 141 ein N2-, bei 58 ein N1- und bei 18 ein N3-Status (s. Publikation, Tabelle 1). In einer etablierten semiquantitativen Analyse wurden die immunhistochemischen Färbeintensitäten von B7-H3 und B7-H4 mit 0, 1, 2 oder 3 bewertet und der jeweilige Prozentsatz der Tumorzellen geschätzt (s. Publikation, Abb. 2A). Der endgültige IHC-Score wurde aus beiden Parametern gebildet, wobei die einzelnen Spots auf dem TMA als *negativ*, *schwach*, *mäßig* oder *stark* eingestuft wurden (siehe Material und Methoden für weitere Einzelheiten). Die Anfärbung beider Proteine war auf die Plasmamembran und / oder das Zytoplasma beschränkt. Insgesamt konnte ein großer Unterschied in der Expression beider Proteine festgestellt werden. In der gesamten Kohorte und in den jeweiligen Tumor-Sublokalisationen war die Färbungskategorie *stark* am häufigsten für B7-H3 vertreten, während eine *negative* Färbung die häufigste Kategorie für das B7-H4-Protein war (s. Publikation, Abb. 2B). Normalgewebe-Kontrollproben der TMA wiesen im Vergleich zu den Tumorproben eine weitaus schwächere B7-H3- und B7-H4-Expression auf: In 50 Normalgewebe-Kontrollproben war die häufigste B7-H3-Färbung *negativ* und die häufigste B7-H4-Färbung *schwach* (s. Publikation, Anhang Abb. 1).

Weiterhin wurde untersucht, ob die Proteinexpressionsmuster miteinander oder mit dem T- oder N-Stadium assoziiert sind. Korrelationsanalysen ergaben hier keine signifikanten Zusammenhänge für beide Immun-Checkpoint-Rezeptoren (s. Publikation, Abb. 2C).

Um auch in den TMA-Analysen den Unterschieden in den pathologischen Mechanismen von HPV+ und HPV- HNSCC Rechnung zu tragen, führten wir zusätzlich separate Analysen bei OPSCC durch, die positiv für den HPV-Surrogatmarker p16 (p16+) waren. Zudem untersuchten wir dies in einer gepoolten Kohorte, die aus p16-negativen (p16-) OPSCC sowie allen LSCC, HSCC und OSCC bestand, bei denen HPV-bedingte Fälle bekanntermaßen nur einen geringen Anteil von weniger als 5 % ausmachen, wenn man zusätzlich zu p16 und/oder HPV-DNA auch HPV E6/E7 mRNA betrachtet (Castellsague et al. 2016, Taberna et al. 2016, Wittekindt et al. 2017, Tagliabue et al. 2020, Nauta et al. 2021, Simoens et al. 2021). Auch hier ergaben die Analysen keine eindeutigen Zusammenhänge (s. Publikation, Anhang Abb. 2).

Zusammenhänge zwischen der Expression von B7-H3- und B7-H4-Proteinen und dem Überleben der Patienten

Im Fall von B7-H3 wurde für die gesamte Kohorte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Proteinexpression und OS festgestellt (s. Publikation, Abb. 3A). In separaten Analysen für

HPV+ OPSCC und in der oben beschriebenen gepoolten Kohorte von weitgehend HPV-HNSCC jedoch wurde ein Unterschied in der Auswirkung von B7-H3 auf das OS beobachtet: Bei Patienten mit HPV+ OPSCC zeigten diejenigen mit Tumoren, die stark B7-H3 exprimierten, einen Trend zu einem schlechteren Überleben. Der Unterschied erreichte in dieser Analyse jedoch keine Signifikanz (s. Publikation, Abb. 3B). Im Gegensatz dazu zeigten Patienten mit HPV- HNSCC, die eine starke B7-H3-Expression aufwiesen, ein signifikant günstigeres ($p=0,019$) (s. Publikation, Abb. 3C). Betrachtet man die einzelnen Sublokalisationen der gepoolten HPV- HNSCC-Kohorte, so wurde ein signifikant besseres OS bei starker B7-H3-Expression für HPV- OPSCC beobachtet ($p=0,038$) (s. Publikation, Abb. 3D). Ein Trend zu besserem OS bei HPV- mit starker B7-H3-Expression wurde außerdem bei Larynxkarzinomen, nicht aber bei Hypopharynxkarzinomen oder bei den wenigen Fällen von Mundhöhlenkarzinomen in unserer Kohorte beobachtet (s. Publikation, Anhang Abb. 3A). Was das Zusammenspiel von B7-H3-Expression und Patientenbehandlung betrifft, so wurde in der gesamten HPV- Kohorte nach primärer Radio(chemo)therapie (RT/RCT) ein signifikant günstigeres Überleben bei starker Expression beobachtet ($p=0,023$) (s. Publikation, Abb. 3E), was weitgehend auf tiefgreifenden Unterschieden bei Kehlkopftumoren und HPV- OPSCC beruhte (s. Publikation, Anhang Abb. 3B).

Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens (RFS) nach primärer RT/RCT wurde bei Patienten mit HPV- HNSCC und HPV- OPSCC und jeweils starker B7-H3-Expression ein Trend zu einem günstigeren Ergebnis beobachtet. Ein signifikant günstigeres RFS zeigte sich bei Larynxkarzinomen mit starker im Vergleich zu schwacher B7-H3-Expression (s. Publikation, Anhang Abb. 4).

Für B7-H4 haben wir die Expressionsmuster auch nach der am häufigsten vorkommenden Kategorie dichotomisiert, was in diesem Fall bedeutet, dass die Färbung *negativ* im Vergleich zu allen anderen steht. Wir konnten keine statistisch unterschiedlichen Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer B7-H4-Färbung feststellen, aber einen Trend zu einem schlechteren Überleben bei Expression in HPV+ OPSCC und der größten Behandlungsgruppe dieser Tumoren, nämlich Patienten, die eine Operation und eine adjuvante RT/RCT erhielten (s. Publikation, Abb. 4). Weitere und größere Kohorten von HPV+ OPSCC werden notwendig sein, um zu klären, ob und inwieweit die B7-H4-Expression bei diesen Tumoren einen prognostischen Marker darstellen kann.

Multivariable Analysen

In einer multivariablen Analyse, die den Expressionsscore, das T- und N-Stadium, das Geschlecht und das Alter einbezog, blieb die Signifikanz für eine starke B7-H3-Expression bei

HPV-negativem HNSCC aus (HR: 0,70, $p=0,10094$) (s. Publikation, Tabelle 2). Im Einklang mit einer schwachen negativen Assoziation der B7-H3-Expression mit dem N-, aber nicht dem T-Stadium, blieb die Signifikanz nur erhalten, wenn das N-Stadium aus den multivariablen Analysen ausgeschlossen wurde (s. Publikation, Anhang Abb. 2). Beim HPV- OPSCC, der Sublokalisierung mit dem stärksten prognostischen Einfluss von B7-H3, blieb die Signifikanz in der multivariablen Analyse auch erhalten, wenn der N-Status einbezogen wurde (HR: 0,3586, $p=0,0303$) (s. Publikation, Tabelle 2).

2.8 Diskussion

Die prognostische und prädiktive Bedeutung der B7-Immunglobulin-Superfamilienmitglieder B7-H3 und B7-H4 ist im Vergleich zu den bekannten Familienmitgliedern PD-L1 und PD-L2 deutlich weniger gut charakterisiert. Für PD-L1 berichtet eine aktuelle Meta-Analyse über ein günstigeres Gesamtüberleben insbesondere bei Patienten mit HPV+ Status, die eine hohe PD-L1-Expression auch unter nicht-immuntherapeutischer Behandlung aufweisen (Polesel et al. 2021). Dies zeigt, dass Faktoren, die eindeutig eine Rolle in der Immunsuppression spielen, für Standardbehandlungen außerhalb der Immuntherapie als positive prognostische Marker dienen können. Bei B7-H3 und B7-H4 sind die spezifischen Rezeptoren für beide Proteine bisher nicht bekannt, was die Klärung ihrer genauen molekularen Funktionen deutlich einschränkt. B7-H3 wurde ursprünglich als immunstimulierendes Molekül beschrieben und mit Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht (Chapoval et al. 2001, Luo et al. 2004, Chen et al. 2020). Im Gegensatz dazu berichten neuere Studien über eine Rolle als Immun-Checkpoint-Molekül, das neben anderen Funktionen sowohl die Anti-Tumor-Reaktion durch T- und NK-Zellen, als auch die Förderung nicht-immunologischer protumorigener Funktionen wie Migration und Invasion, Angiogenese oder Chemoresistenz sowie die Auswirkungen auf den Tumorstoffwechsel einschränkt (Kontos et al. 2021, Zhou und Jin 2021). Es wurde berichtet, dass B7-H3 bei vielen Krebsarten auf der Oberfläche von Tumorzellen stark exprimiert wird, während es auf normalem Gewebe nur schwach ausgeprägt ist. Daher wurde B7-H3 als Pan-Krebs-Antigen bezeichnet, und es wurden und werden verschiedene präklinische Studien und klinische Versuche durchgeführt, um B7-H3 als tumorspezifisches therapeutisches Ziel zu nutzen. Ein Beispiel hierfür sind bi-spezifische Antikörper (Anti-CD3 x Anti-B7-H3), die Immunzellen mit Tumorzellen verbinden oder CAR-T-Zellen (Yang et al. 2020, Kontos et al. 2021, Zhou und Jin 2021). Eine Rolle als Angriffspunkt für Immun-Checkpoint-Inhibition, allein oder in Kombination mit der PD1/PD-L1-Achse, zeichnet sich auch bei HNSCC ab. In diesem Fall können sowohl die Blockade des Immun-Checkpoints durch die Hemmung von B7-H3, als auch die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität

(ADCC) aufgrund der hohen Menge an Antikörpern, die an Tumorzellen mit starker B7-H3-Expression binden, zu einem bedeutenden Anti-Tumoreffekt beitragen (Aggarwal et al. 2022). Was die prognostische Bedeutung von B7-H3 bei HNSCC betrifft, so wurde hauptsächlich beobachtet, dass B7-H3 mit einer schlechteren Überlebensrate und einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert ist. Allerdings sind die Daten sowohl für B7-H3 als auch für B7-H4, eher spärlich. Was die Expression von B7-H4 betrifft, so haben unsere Daten einen negativen prognostischen Wert bei HPV- HNSCC nicht bestätigt, zeigen aber einen Trend zu einer schlechteren Prognose bei HPV+ OPSCC. In unserer begrenzten Kohorte wurde jedoch keine Signifikanz erreicht und es sind weitere, bestenfalls größere Kohorten von HPV+ OPSCC erforderlich, um diese Frage zu klären.

Für B7-H3 bestätigen unsere TMA-Daten eindeutig eine hohe Expression in HNSCC, was mit früheren Studien übereinstimmt (Hu et al. 2019), wobei insgesamt etwas mehr als 60 % der Proben als *stark* gefärbt eingestuft wurden, während in den normalen Gewebekontrollstellen meist eine *schwache* oder *negative* Färbung beobachtet wurde. Wir konnten jedoch keine Assoziation der B7-H3-Expression mit fortgeschrittenen Tumorstadien oder schlechterem Überleben feststellen, sondern beobachteten überraschenderweise sogar ein mäßig günstigeres Überleben bei Patienten mit HPV- Tumoren, die eine hohe Expression aufwiesen. Multivariable Analysen deuten darauf hin, dass dieses günstige Überleben mit einem geringeren Lymphknotenbefall zusammenhängen könnte und dass die aussagekräftigsten prognostischen Auswirkungen bei HPV- OPSCC bestehen könnten.

Im Gegensatz dazu konnten wir im TCGA-Datensatz auf Grundlage der mRNA-Expressionsmuster für B7-H3 und B7-H4 keinen eindeutigen Unterschied in Bezug auf das Überleben der Patienten in der HPV- HNSCC-Subkohorte feststellen. Für diese Diskrepanz sind verschiedene Erklärungen denkbar: Auf der einen Seite können Proteinebenen posttranskriptionell reguliert werden und sich daher von den mRNA-Expressionsniveaus unterscheiden. Die in beiden Methoden verwendeten Cutoffs sind unterschiedlich, wenn man die oberen und unteren Quartile vergleicht, die unabhängig von den absoluten Expressionsmustern in der mRNA-Analyse im Vergleich zu einem IHC-Score verwendet werden können, bei dem mehr als 50 % der Tumorproben als *stark* eingestuft wurden. Bemerkenswert ist, dass die Aufteilung nach dem Median der mRNA-Expressionsmuster, die in diesem Vergleich möglicherweise dem TMA-Scoring näher kommt, keine ähnlicheren Ergebnisse lieferte. Ein potenzieller Nachteil von IHC-Analysen ist die Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern. Da es sich bei dem hier verwendeten B7-H3-Antikörper jedoch um einen Klon handelt, dessen Spezifität durch Knockout-Experimente getestet wurde, sind wir

bezüglich der Qualität unserer Färbung sehr zuversichtlich. Zudem enthält die TCGA-Kohorte weniger Oropharynx- und mehr Mundhöhlenkarzinome als unsere TMA-Kohorte. Die Auswirkung in spezifischen Untergruppen sollte weiter untersucht werden, was jedoch große Kohorten erfordert. Ein weiterer wichtiger Parameter bei der Bewertung der Patientenergebnisse ist die Art der Behandlung, die die Patienten erhielten. Leider wurden diese Daten in früheren Studien meist nicht erhoben (Katayama et al. 2011, Hu et al. 2019). In einer Studie von Li et al. wurde das schlechtere Ergebnis von LSCC-Patienten mit hoher B7-H3-Expression in einer Kohorte von primär operierten Patienten beobachtet (Li et al. 2021). Unsere Ergebnisse deuten nun auf ein günstigeres Überleben von Patienten mit HPV- Tumoren mit hoher B7-H3-Expression hin, insbesondere wenn sie mit einer primären Radio(chemo)therapie behandelt werden. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die begrenzte Anzahl von Patienten, die in diesen beiden Untergruppen mit primärer RT/RCT behandelt wurden, zur Vorsicht bei der Interpretation der Daten mahnt und bestätigende Studien erforderlich sind. Ob und in welchem Ausmaß immunmodulatorische oder immununabhängige Funktionen von B7-H3 zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber einer Radio(chemo)therapie von HPV- HNSCC mit starker B7-H3-Expression beitragen und ob dies bei einer möglichen Kombinationstherapie mit Anti-B7-H3-Antikörpern berücksichtigt werden muss, ist eine wichtige Frage für zukünftige Forschung.

2.9 Schlussfolgerung

In Zeiten der individualisierten Krebstherapie stellt die Hemmung von Immun-Checkpoint-Rezeptoren einen vielversprechenden Therapieangriffspunkt dar. In dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster sowie die Auswirkung der Expression von B7-H3 und B7-H4 auf das Gesamt- sowie das rezidivfreie Überleben von Patienten mit HNSCC untersucht, um herauszufinden, ob B7-H3 und B7-H4 in der Zukunft als potentiell Target für eine spezifische Anti-Tumor-Therapie auch bei Kopf-Hals-Tumoren dienen könnten.

Wir konnten keine Assoziation der B7-H3-Expression mit fortgeschrittenen Tumorstadien oder schlechterem Überleben feststellen, sondern beobachteten stattdessen sogar ein mäßig günstigeres Überleben bei Patienten mit HPV- Erkrankungen, deren Tumoren eine hohe Expression von B7-H3 aufwiesen. Zudem hängt die hohe Expression von B7-H3 in der untersuchten Kohorte mit einem geringeren Lymphknotenbefall zusammen. Für B7-H3 zeigt sich das deutlichste prognostische Potential bei HPV- OPSCC.

Bei B7-H4 wurde ein negativer prognostischer Wert bei HPV- HNSCC nicht bestätigt, es zeigte sich aber einen Trend zu einer schlechteren Prognose bei HPV+ OPSCC mit hoher B7-H4-Expression. Aus diesem Grund sind weitere, und im idealen Falle größere Kohorten von

HPV+ OPSCC und HPV- HNSCC einschließende, Studien, bestenfalls auch mit größeren Kohorten von Patienten mit Karzinomen anderer anatomischer Unterregionen im Kopf-Halsbereich, erforderlich, um dieser Fragestellung weiter nachzugehen und die zugrundeliegenden Mechanismen und die möglichen Auswirkungen einer gezielten Behandlung mit B7-H3 als Target bei HNSCC weiter zu untersuchen. Dies stellt einen Ansatz für zukünftige Studien dar.

3. Literaturverzeichnis

Aggarwal, C., Prawira, A., Antonia, S., Rahma, O., Tolcher, A., Cohen, R.B., Lou, Y., Hauke, R., Vogelzang, N., D, P.Z., et al. (2022). Dual checkpoint targeting of B7-H3 and PD-1 with enoblituzumab and pembrolizumab in advanced solid tumors: interim results from a multicenter phase I/II trial. *J Immunother Cancer* 10(4), e004424.

Bubendorf, L., Kononen, J., Koivisto, P., Schraml, P., Moch, H., Gasser, T.C., Willi, N., Mihatsch, M.J., Sauter, G., and Kallioniemi, O.P. (1999). Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 59(4), 803-806.

Burtneß, B., Harrington, K.J., Greil, R., Soulieres, D., Tahara, M., De Castro, G., Jr., Psyrrri, A., Baste, N., Neupane, P., Bratland, A., et al. (2019). Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 394, 1915-1928.

Castellsague, X., Alemany, L., Quer, M., Halc, G., Quiros, B., Tous, S., Clavero, O., Alos, L., Biegner, T., Szafarowski, T., et al. (2016). HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst* 108(6), djv403.

Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., et al. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2(5), 401-404.

Chapoval, A.I., Ni, J., Lau, J.S., Wilcox, R.A., Flies, D.B., Liu, D., Dong, H., Sica, G.L., Zhu, G., Tamada, K., et al. (2001). B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2(3), 269-274.

Chen, L., Jin, M., Li, C., Shang, Y., and Zhang, Q. (2017). The tissue distribution and significance of B7-H4 in laryngeal carcinoma. *Oncotarget* 8(54), 92227-92239.

Chen, Y., Guan, S.Y., Deng, J., Yang, H., Xu, W., Xu, S., Shao, M., Gao, X., Xu, S., Shuai, Z., et al. (2020). B7-H3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Cell Immunol* 352, 104077.

Cohen, N., Fedewa, S., and Chen, A.Y. (2018). Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 30(4), 381-395.

Dancau, A.M., Simon, R., Mirlacher, M., and Sauter, G. (2016). Tissue Microarrays. *Methods Mol Biol* 1381, 53-65.

Ding, S., Lv, X., Liu, Z., Zhan, S., Xu, Y., Zhang, X., Liu, C., and Cao, L. (2021). Overexpression of B7-H4 is associated with infiltrating immune cells and poor prognosis in metastatic colorectal cancer. *Int Immunopharmacol* 90, 107144.

Du, E., Mazul, A.L., Farquhar, D., Brennan, P., Anantharaman, D., Abedi-Ardekani, B., Weissler, M.C., Hayes, D.N., Olshan, A.F., and Zevallos, J.P. (2019). Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *Laryngoscope* 129(11), 2506-2513.

- Ferris, R.L., Blumenschein, G., Jr., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A.D., Licitra, L., Harrington, K.J., Kasper, S., Vokes, E.E., Even, C., et al. (2018). 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* 81, 45-51.
- Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., et al. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6(269), p11.
- Hu, J., Jiang, C., Zheng, M., Guo, Y., Tang, X., Ren, J., Lu, D., Yu, L., Gan, W., Liu, S., et al. (2019). Overexpression of B7-H3 as an opportunity for targeted therapy in head and neck cancers. *Am J Transl Res* 11(8), 5183-5196.
- Huang, S.H., and O'sullivan, B. (2017). Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 18(7), 40.
- Huber, W., Carey, V.J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B.S., Bravo, H.C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., et al. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* 12(2), 115-121.
- Ingebrigtsen, V.A., Boye, K., Tekle, C., Nesland, J.M., Flatmark, K., and Fodstad, O. (2012). B7-H3 expression in colorectal cancer: nuclear localization strongly predicts poor outcome in colon cancer. *Int J Cancer* 131(11), 2528-2536.
- Kassambara, A., and Kosinski, M. (2018). survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4.3. <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>.
- Katayama, A., Takahara, M., Kishibe, K., Nagato, T., Kunibe, I., Katada, A., Hayashi, T., and Harabuchi, Y. (2011). Expression of B7-H3 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma as a predictive indicator for tumor metastasis and prognosis. *Int J Oncol* 38, 1219-1226.
- Kontos, F., Michelakos, T., Kurokawa, T., Sadagopan, A., Schwab, J.H., Ferrone, C.R., and Ferrone, S. (2021). B7-H3: An Attractive Target for Antibody-based Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 27(5), 1227-1235.
- Li, H., Yang, Z., Yang, X., Zhang, F., Wang, J., Wu, Z., Wanyan, C., Meng, Q., Gao, W., Yang, X., et al. (2022). LINC01123 promotes immune escape by sponging miR-214-3p to regulate B7-H3 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Cell Death Dis* 13(2), 109.
- Li, Y., Cai, Q., Shen, X., Chen, X., and Guan, Z. (2021). Overexpression of B7-H3 Is Associated With Poor Prognosis in Laryngeal Cancer. *Front Oncol* 11, 759528.
- Luo, L., Chapoval, A.I., Flies, D.B., Zhu, G., Hirano, F., Wang, S., Lau, J.S., Dong, H., Tamada, K., Flies, A.S., et al. (2004). B7-H3 enhances tumor immunity in vivo by costimulating rapid clonal expansion of antigen-specific CD8⁺ cytolytic T cells. *J Immunol* 173(9), 5445-5450.
- Mami-Chouaib, F., Blanc, C., Corgnac, S., Hans, S., Malenica, I., Granier, C., Tihy, I., and Tartour, E. (2018). Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. *J Immunother Cancer* 6(1), 87.
- Meng, Z., Wang, F., Zhang, Y., Li, S., and Wu, H. (2017). B7-H4 as an independent prognostic indicator of cancer patients: a meta-analysis. *Oncotarget* 8(40), 68825-68836.

- Nauta, I.H., Heideman, D.a.M., Brink, A., Van Der Steen, B., Bloemena, E., Koljenovic, S., Baatenburg De Jong, R.J., Leemans, C.R., and Brakenhoff, R.H. (2021). The unveiled reality of human papillomavirus as risk factor for oral cavity squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 149(2), 420-430.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12(4), 252-264.
- Polesel, J., Menegaldo, A., Tirelli, G., Giacomarra, V., Guerrieri, R., Baboci, L., Casarotto, M., Lupato, V., Fanetti, G., Boscolo-Rizzo, P., et al. (2021). Prognostic Significance of PD-L1 Expression In Patients With Primary Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Front Oncol* 11, 787864.
- Robert, C. (2020). A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat Commun* 11(1), 3801.
- Simoens, C., Gorbaslieva, I., Gheit, T., Holzinger, D., Lucas, E., Ridder, R., Rehm, S., Vermeulen, P., Lammens, M., Vanderveken, O.M., et al. (2021). HPV DNA genotyping, HPV E6*I mRNA detection, and p16(INK4a)/Ki-67 staining in Belgian head and neck cancer patient specimens, collected within the HPV-AHEAD study. *Cancer Epidemiol* 72, 101925.
- Simon, R., Mirlacher, M., and Sauter, G. (2010). Immunohistochemical analysis of tissue microarrays. *Methods Mol Biol* 664, 113-126.
- St Paul, M., and Ohashi, P.S. (2020). The Roles of CD8(+) T Cell Subsets in Antitumor Immunity. *Trends Cell Biol* 30(9), 695-704.
- Steurer, S., Schneider, J., Buscheck, F., Luebke, A.M., Kluth, M., Hube-Magg, C., Hinsch, A., Hoflmayer, D., Weidemann, S., Fraune, C., et al. (2021). Immunohistochemically detectable thyroglobulin expression in extrathyroidal cancer is 100% specific for thyroidal tumor origin. *Ann Diagn Pathol* 54, 151793.
- Taberna, M., Resteghini, C., Swanson, B., Pickard, R.K., Jiang, B., Xiao, W., Mena, M., Kreinbrink, P., Chio, E., and Gillison, M.L. (2016). Low etiologic fraction for human papillomavirus in larynx squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 61, 55-61.
- Tagliabue, M., Mena, M., Maffini, F., Gheit, T., Quiros Blasco, B., Holzinger, D., Tous, S., Scelsi, D., Riva, D., Grosso, E., et al. (2020). Role of Human Papillomavirus Infection in Head and Neck Cancer in Italy: The HPV-AHEAD Study. *Cancers (Basel)* 12(12), 3567.
- Therneau, T.M., and Grambsch, P.M. (2000). *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer, New York. ISBN 0-387-98784-3.
- Waldman, A.D., Fritz, J.M., and Lenardo, M.J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 20(11), 651-668.
- Wang, C., Li, Y., Jia, L., Kim, J.K., Li, J., Deng, P., Zhang, W., Krebsbach, P.H., and Wang, C.Y. (2021). CD276 expression enables squamous cell carcinoma stem cells to evade immune surveillance. *Cell Stem Cell* 28, 1597-1613 e1597.
- Wei, T., and Simko, V. (2017). R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version .84). <https://github.com/taiyun/corrplot>.

- Wickham, H. (2007). Reshaping Data with the reshape Package. *Journal of Statistical Software* 21(12), 1-20. <http://www.jstatsoft.org/v21/i12/>.
- Wittekindt, C., Wuerdemann, N., Gattenlohner, S., Brobeil, A., Wierzbicka, M., Wagner, S., and Klussmann, J.P. (2017). The role of high-risk human papillomavirus infections in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 274(11), 3837-3842.
- Wu, L., Deng, W.W., Yu, G.T., Mao, L., Bu, L.L., Ma, S.R., Liu, B., Zhang, W.F., and Sun, Z.J. (2016). B7-H4 expression indicates poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 65, 1035-1045.
- Xu, H., Chen, X., Tao, M., Chen, K., Chen, C., Xu, G., Li, W., Yuan, S., and Mao, Y. (2016). B7-H3 and B7-H4 are independent predictors of a poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Oncol Lett* 11(3), 1841-1846.
- Yang, S., Wei, W., and Zhao, Q. (2020). B7-H3, a checkpoint molecule, as a target for cancer immunotherapy. *Int J Biol Sci* 16(11), 1767-1773.
- Zheng, Y., Liao, N., Wu, Y., Gao, J., Li, Z., Liu, W., Wang, Y., Li, M., Li, X., Chen, L., et al. (2019). High expression of B7H2 or B7H3 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 19(5), 4315-4325.
- Zhou, W.T., and Jin, W.L. (2021). B7-H3/CD276: An Emerging Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 12, 701006.
- Zhuang, R.Y., and Xu, H.G. (2020). Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 382(20), e57.

4. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
CAR-T cells	Chimeric antigen receptor T cells
CSC	Cancer stem cells
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EMT	Epithelial mesenchymal transition
HNSCC	Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses
HR	Hazard ratio
HSCC	Plattenepithelkarzinome des Hypopharynx
HPV	Humanes Papillomavirus
IHC-Score	Immunhistochemischer Score
LSCC	Plattenepithelkarzinome des Larynx
miRNA	micro-Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OPSCC	Plattenepithelkarzinome des Oropharynx
OS	Gesamtüberleben
OSCC	Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle
RCT	Radiochemotherapie
RFS	rezidivfreies Überleben
RT	Radiotherapie
RNA	Ribonukleinsäure
SCC	Plattenepithelkarzinome
Tbl.	Tabelle
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumor, Nodus und Metastasen
UICC	Union internationale contre le cancer
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

5. Zusammenfassung

5.1 Kurzfassung

Die Blockierung von Immuncheckpoint-Rezeptoren zählt heutzutage wie bei vielen anderen Tumorentitäten, auch bei HNSCC zu einer wirksamen Therapieoption. Es hat sich gezeigt, dass die Hemmung der PD-1/PD-L1-Achse in Kombination mit etablierten Therapieverfahren das Gesamtüberleben bei der Erstlinienbehandlung von PD-L1-exprimierendem rezidivierendem oder metastasiertem HNSCC verbessert. Die gut untersuchten Vertreter PD-L1 und PD-L2 zählen zu der B7-Immunglobulin-Superfamilie, welche sowohl Immunstimulatoren als auch potente Immun-Checkpoint-Inhibitoren umfasst, darunter auch die Proteine B7-H3 und B7-H4, welche zunächst auf vielen Oberflächen von Normalgewebe zu finden sind. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass in anderen Tumorentitäten eine erhöhte Expression von B7-H3 und B7-H4 auf der Tumorzelloberfläche mit einem schlechteren klinischen Outcome einherging. In HNSCC sind diese Proteine in Hinblick auf das Gesamtüberleben bisher noch nicht ausreichend beschrieben worden.

Aus diesem Grund wurden nun die Proteine B7-H3 und B7-H4 auf der Zelloberfläche von HNSCC-Tumorzellen in einer retrospektiven Studie auf einem Gewebe-Mikroarray am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf angefärbt. Anhand der Farbintensitäten wurden klinisch-pathologische Parameter mit Daten des TCGA-Datensatzes auf mRNA-Ebene und Überlebensdaten der Patientenkohorte in Beziehung gesetzt. Auf mRNA-Ebene konnte kein Zusammenhang zwischen Proteinexpression und klinischem Outcome gezeigt werden. Auf TMA-Ebene zeigte sich auf den HNSCC-Tumorzellen eine hohe Expression von B7-H3; B7-H4 hingegen zeigte nahezu keine Expression. Insgesamt zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen B7-H3-Expression und Prognose. Aufgrund der unterschiedlichen pathologischen Mechanismen in HPV- und HPV+ Tumoren wurden diese beiden Gruppen jedoch anschließend gesondert untersucht. Bei HPV- HNSCC in unserer Kohorte ging nun eine hohe Expression von B7-H3 mit einer signifikant günstigeren Prognose einher. Anhand statistischer Analysen zeigte sich weiter, dass in einer gepoolten Kohorte von Patienten (HPV- OPSCC sowie Larynx-, Hypopharynx- und Mundhöhlenkarzinomen) bei HPV- OPSCC eine starke B7-H3-Expression mit einem besseren Gesamtüberleben einherging. Bei HPV+ HNSCC und bei HPV+ OPSCC waren sowohl die B7-H3-Expression als auch die B7-H4-Expression nicht mit dem klinischen Outcome assoziiert.

Zusammengefasst bieten die Ergebnisse dieser Studie einen tieferen Einblick in die Expressionsmuster und das damit verbundene klinische Outcome von B7-H3 und B7-H4 bei HNSCC. Sie zeigen, dass eine gezielte Behandlung mit B7-H3 als Target bei der Therapie von HNSCC einen weiter zu verfolgenden Therapieansatz darstellen. Die zugrundeliegenden

Mechanismen und die möglichen Auswirkungen einer gezielten Behandlung mit B7-H3 als Target müssen noch weiter geklärt werden und stellen Grundlage für zukünftige Studien dar.

5.2 Summary

Blocking immune checkpoint receptors is nowadays an effective therapeutic option in HNSCC as in many other tumor entities. Inhibition of the PD-1/PD-L1 axis in combination with established therapeutic modalities has been shown to improve overall survival in first-line treatment of PD-L1-expressing recurrent or metastatic HNSCC. The well-studied agents PD-L1 and PD-L2 belong to the B7 immunoglobulin superfamily, which includes both immunostimulators and potent immune checkpoint inhibitors, including the B7-H3 and B7-H4 proteins, which are initially found on many surfaces of normal tissue. However, it has previously been shown that in other tumor entities increased expression of B7-H3 and B7-H4 on the tumor cell surface was associated with poorer clinical outcome. In HNSCC, these proteins have not yet been adequately described with respect to overall survival. Therefore, the B7-H3 and B7-H4 proteins on the cell surface of HNSCC tumor cells were now stained in a retrospective study on a tissue microarray at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. Using the color intensities, clinicopathological parameters were correlated with data from the TCGA dataset at the mRNA level and survival data from the patient cohort. At the mRNA level, no relationship was shown between protein expression and clinical outcome. At the TMA level, HNSCC tumor cells showed high expression of B7-H3; however, B7-H4 showed almost no expression. Overall, there was no significant correlation between B7-H3 expression and prognosis. However, due to the different pathological mechanisms in HPV- and HPV+ tumors, these two groups were subsequently studied separately. In HPV- HNSCC in our cohort high expression of B7-H3 was now associated with a significantly more favorable prognosis. Using statistical analyses, we further showed that in a pooled cohort of patients (HPV- OPSCC as well as laryngeal, hypopharyngeal, and oral cavity carcinomas) high B7-H3 expression was associated with better overall survival in HPV- OPSCC. In HPV+ HNSCC and in HPV+ OPSCC, both B7-H3 expression and B7-H4 expression were not associated with clinical outcome.

In summary, the results of this study provide deeper insight into the expression patterns and associated clinical outcome of B7-H3 and B7-H4 in HNSCC. They demonstrate that targeting B7-H3 in the therapy of HNSCC is a therapeutic approach to be pursued further. The underlying mechanisms and potential effects of targeted treatment with B7-H3 need to be further elucidated and provided basis for future studies.

6. Erklärung des Eigenanteils

Um das Expressionsmuster der Proteine B7-H3 und B7-H4 in Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches zu untersuchen, wurde der bereits vorhandenen TMA des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) verwendet. Die Färbungen der einzelnen Marker auf den zugehörigen Spots des TMA wurden von Pathologen des UKE gefärbt und analysiert.

Meine Aufgabe bestand darin klinische Patientendaten im Zeitraum von 1992 bis 2013 anhand von bereits bestehenden Tabellen zu sichten und die Daten anhand einer einheitlichen Excel-Tabelle darzustellen. Begleitend habe ich zudem klinische Daten von einzelnen Tumorpatienten aus den archivierten Patientenakten der Abteilung für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde des UKE aktualisiert und die Tabelle vervollständigt. Um die klinischen Daten für eine bessere Analyse noch tiefgehender zu vervollständigen, stellte ich einen Antrag beim Deutschen Krebsregister (DKR), wofür ich mir im Voraus auf postalischem Wege das Einverständnis der betroffenen Patienten einholte. Diese fügte ich anschließend ebenfalls in die Tabelle der klinischen Datensätze zu unserem TMA ein. Zusammen mit Prof. Dr. Adrian Münscher und PD Dr. Thorsten Rieckmann stand ich in regelmäßigem Austausch bezüglich der Aktualisierung der Tabelle und formulierte Fragestellung und Ziele sowie die Hypothese für meine wissenschaftliche Arbeit. In mehreren Meetings mit PD Dr. T. Rieckmann sowie Dr. Conrad Droste erarbeiteten wir die statistischen Analysen, welche wir für unsere Fragestellung benötigten, die daraufhin durch Dr. Conrad Droste durchgeführt wurden. In einer umfangreichen Literaturrecherche über PubMed erlangte ich Kenntnisse im Bereich der Immunmodulation durch Immuncheckpoint-Inhibitoren und stellte Nachforschungen bezüglich aktueller Fragestellungen zu den Proteinen der B7-Superfamilie B7-H3 und B-H4 bei Kopf-Hals-Tumoren und anderen Tumorentitäten an. Die durch die statistischen Analysen erlangten Ergebnisse setzte ich in zahlreichen Videokonferenzen zusammen mit PD Dr. T. Rieckmann und Prof. Dr. Kerstin Borgmann in Bezug zur aktuellen Literatur und diskutierte diese ausführlich. Ich formulierte weitere Fragestellungen, welche unsere Ergebnisse noch deutlicher mit der aktuellen Literatur zu der prognostischen Rolle von B7-H3 und B7-H4 in anderen Tumorentitäten in Zusammenhang setzte.

Weitere statistische Analysen erarbeitete ich in Zusammenarbeit mit Dipl.-Phys. Agnes Oetting mit Hilfe von R und der Bioconductor-Umgebung zur Datenverarbeitung, -analyse und -auswertung sowie der Überlebensanalysen nach der Kaplan-Meier-Methode und dem Log-rank-Test mit den R-Paketen "survival" und "survminer". Nach deren Auswertung erstellte ich die Abbildungen 1, 2A und B und die Tabellen 1 und 2, sowie die dazu gehörigen supplementären Daten mittels der GraphPad Prism-Software und Microsoft Word. Die erste

Version der Abschnitte „Einleitung, Ergebnisse und Diskussion“ sowie die Erstellung des Literaturverzeichnisses habe ich verfasst.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen ganz herzlich für die Unterstützung und Begleitung meiner Dissertation bedanken.

Mein Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Adrian Münscher, der mir bei der Auswahl des Themas die Möglichkeit gegeben hat, mein eigenes Interesse an der Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde mit der wissenschaftlichen Arbeit in diesem Fachgebiet erstmalig zu verbinden. Hierdurch hat er mich in der Wahl meines Facharztgebietes bestärkt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Thorsten Rieckmann, der mich als Betreuer meines Papers und der daraus entstandenen Dissertation in vier Jahren begleitet hat. Durch sein umfangreiches Wissen auf dem Gebiet der Immunmodulation von Krebszellen sowie der Immun-Checkpoint-Blockade, vor allem auch im Bereich der Kopf- und Hals-Tumore, stand er mir mit gezielten und zielführenden Ratschlägen zur Seite und hat meine Arbeit dadurch wegweisend begleitet. Er hat sich hierbei in vielen Zoom-Meetings Zeit für mich genommen und war stets offen für anregende Diskussionen. Zudem hat er meine Arbeit mit neuen Ansätzen und seiner jahrelangen Erfahrungen vielschichtig bereichert.

Danken möchte ich auch PD Dr. Till Clauditz für die Bereitstellung der Daten und Abbildungen aus dem TMA-Datensatzes des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf sowie für die Begleitung meiner Arbeit bei allen pathologischen Fragestellungen.

Ich danke ebenfalls Dipl.-Phys. Agnes Oetting für die Unterstützung und Begleitung aller statistischen Auswertungen und Fragen sowie für die zeitnahe graphische Umsetzung aller neuen Ansätze und Fragestellungen, die sich in vielen Zoom-Meetings ergeben haben.

Ebenso möchte ich Dr. Felix Meyer danken, welcher mir mit seinen Kenntnissen den TCGA-Datensatz nähergebracht hat und mir bei den jeweiligen Auswertungen unter die Arme gegriffen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Kerstin Borgmann. Sie hat mich schon seit meiner Kindheit an das wissenschaftliche Arbeiten im medizinischen Bereich herangeführt und mir die Freude an wissenschaftlichem Austausch im Rahmen von Diskussionen über ein gemeinsames Thema mit in die Wiege gelegt. Sie hat diese Arbeit zielführend aus dem Hintergrund begleitet und mich in schwierigen Situationen auf den richtigen Weg geleitet. Aus ihrer Zusammenarbeit mit PD Dr. Thorsten Rieckmann in unseren Diskussionen und Meetings konnte ich für das wissenschaftliche Arbeiten Essentielles lernen und für meinen weiteren Weg mitnehmen.

Ich danke zudem meiner weiteren Familie sowie allen Menschen, die mich auf meinem bisherigen Weg begleitet haben und Momente der Resignation sowie auch Momente des Erfolges uneingeschränkt mit mir geteilt haben.

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: