

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. Andreas Knopf

Expressionsanalyse der Epidermal Growth Factor Receptor Variante III bei Plattenepithelkarzinomen
des Kopf-Hals-Bereiches

Dominik Thomas Koch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Anja C. Pickhard
2. apl. Prof. Dr. Gisela Keller

Die Dissertation wurde am 18.02.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 11.06.2019 angenommen.

Meinen Eltern.

1 Inhaltsverzeichnis

2	Einleitung und wissenschaftliche Grundlagen	4
2.1	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches	4
2.2	Klassifikation nach TNM	5
2.3	Klassifikation nach TNM bei Kopf- und Halstumoren	6
2.3.1	Lippen und Mundhöhle	6
2.3.2	Pharynx.....	7
2.3.3	Larynx	8
2.3.4	Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen.....	9
2.3.5	Hinweis auf Neuerungen der TNM-Klassifikation	10
2.4	Therapie und Prognose von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches	10
2.4.1	Therapie im Frühstadium	10
2.4.2	Therapie im lokal fortgeschrittenen Stadium	11
2.4.3	Neck Dissection.....	12
2.4.4	Therapie des rezidierten oder fernmetastasierten Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches.....	13
2.4.5	Zielgerichtete Therapien.....	13
2.5	Molekulare Grundlagen.....	14
2.5.1	Epidermal Growth Factor Receptor und dessen Bedeutung in der zielgerichteten Tumortherapie	16
2.5.2	Epidermal Growth Factor Receptor Variante III	19
2.6	Bedeutung von EGFRvIII in der Behandlung von Glioblastomen.....	22
3	Darstellung der Problematik und Zielsetzung dieser Arbeit	24
4	Material und Methoden	25
4.1	Material	25
4.1.1	Patientenkollektiv und Gewebeproben.....	25
4.1.1.1	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches	25
4.1.1.2	Glioblastomgewebe	27
4.1.2	Zelllinien	27
4.1.3	Verwendete Kits	27
4.1.4	Reagenzien	28
4.1.5	Geräte	28
4.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	29
4.1.7	Computerprogramme.....	29
4.1.8	EGFRvIII-Antikörper	29
4.1.9	PCR-Primer	29

4.2	Methoden.....	30
4.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Routinefärbung.....	30
4.2.2	Immunhistochemie.....	31
4.2.3	Zellkultur.....	33
4.2.4	Lipotransfektion von Zelllinien.....	33
4.2.5	RNA-Isolierung.....	34
4.2.5.1	RNA-Isolierung aus FFPE-Material.....	34
4.2.5.2	RNA-Isolierung aus Frischgewebe.....	35
4.2.5.3	RNA-Isolierung aus Zellkulturen.....	35
4.2.6	RNA-Konzentrationsmessung.....	35
4.2.7	cDNA-Synthese.....	36
4.2.8	Polymerase Kettenreaktion.....	36
4.2.9	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
4.2.10	Sequenzierung.....	39
4.2.11	Statistik.....	39
5	Ergebnisse.....	40
5.1	Hinweis auf eigene Publikation.....	40
5.2	Immunhistochemie.....	40
5.3	Polymerase Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese.....	41
5.4	Sequenzierung.....	45
5.5	Einfluss von Alter und Fixierungsmethode des Gewebes auf den Nachweis von EGFRvIII.....	48
5.6	Ereigniszeitanalyse und prognostische Relevanz von EGFRvIII.....	50
6	Diskussion.....	52
6.1	Einordnung in die Literatur.....	52
6.1.1	EGFRvIII bei verschiedenen Tumorentitäten.....	52
6.1.2	EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.....	53
6.2	Herausforderungen im Rahmen des experimentellen Arbeitens mit EGFRvIII.....	54
6.3	Diskussion der Ergebnisse.....	55
7	Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....	58
8	Summary and Conclusion.....	59
9	Abkürzungsverzeichnis.....	60
10	Abbildungsverzeichnis.....	63
11	Tabellenverzeichnis.....	65
12	Literaturverzeichnis.....	67
13	Danksagung.....	80

2 Einleitung und wissenschaftliche Grundlagen

2.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Bösartige Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches gelten weltweit betrachtet als die am sechsthäufigsten auftretende Tumorentität [Denaro et al., 2014, Hunter et al., 2005, Martinez-Useros and Garcia-Foncillas, 2015, Parkin et al., 2005, Torre et al., 2015]. Man geht von einer globalen Inzidenz von deutlich über einer halben Million Fälle jährlich aus [Martinez-Useros and Garcia-Foncillas, 2015], wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen [Denaro et al., 2014]. 90 bis 95 % aller Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches stellen dabei Plattenepithelkarzinome dar [Bose et al., 2013, Martinez-Useros and Garcia-Foncillas, 2015].

In der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde werden unter Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (engl. head and neck squamous cell cancer, HNSCC oder auch squamous cell carcinoma of the head and neck, SCCHN) im engeren Sinne Karzinome der Mundhöhle, des Larynx, des Hypo- und des Oropharynx zusammengefasst. Plattenepithelkarzinome der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen (engl. sinonasal squamous cell cancer, SNSCC) umfassen Karzinome der Nasenhaupthöhle, der Kiefer-, Keilbein- und Stirnhöhlen sowie Siebbeinzellen. Als Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches werden, wie auch in dieser Arbeit, oft HNSCC und SNSCC zusammen eingeordnet.

Kopf-Hals-Tumoren sind multifaktoriell bedingt. Bekannte und bedeutende Risikofaktoren sind vor allem Rauchen [Brennan et al., 1995, Pfeifer et al., 2002] und Alkoholkonsum [Lewin et al., 1998]. Besonders gravierend ist die Kombination des Tabakkonsums mit dem Genuss von hochprozentigem Alkohol [Blot et al., 1988, Hashibe et al., 2009, Vigneswaran and Williams, 2014]. Auch der Konsum von Schnupf- und Kautabakerzeugnissen und das vor allem in Ländern wie Indien, Pakistan, Bangladesch und Sri Lanka übliche Kauen von Betelnüssen erhöhen das Auftreten von Plattenepithelkarzinomen [Vigneswaran and Williams, 2014]. Außerdem stellt die Infektion mit humanen Papillomviren (HPV), insbesondere die Infektion mit high risk HPV Typen 16, 18, 31 und 33, einen Risikofaktor dar [Mork et al., 2001, Vigneswaran and Williams, 2014].

Speziell bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx ist eine zunehmend starke Assoziation mit HPV Infektionen nachweisbar [Chaturvedi et al., 2011]. Über 70 % der Plattenepithelkarzinome des Oropharynx in Nordamerika sind HPV-positiv [Chaturvedi et al., 2011, Denaro et al., 2014, Steinau et al., 2014]. Besonders HPV 16 ist auffallend häufig nachweisbar [Chaturvedi et al., 2011, Denaro et al., 2014, Steinau et al., 2014, Vigneswaran and Williams, 2014]. Interessanter Weise haben HPV-positive Tumoren, vor allem bei fehlenden anderen Risikofaktoren eine deutlich bessere Prognose [Ang et al., 2010]. Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, des Larynx und des Hypopharynx hingegen sind eher mit den Risikofaktoren Rauchen und Alkoholkonsum assoziiert [Denaro et al., 2014].

Vor allem bei den Risikofaktoren Rauchen und Alkohol besteht durch die Exposition der gesamten bzw. von großen Teilen der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes und damit durch die generelle Akkumulation von genetischen Veränderungen ein erhöhtes Risiko für multifokale, syn- und metachrone Tumoren. Dieses Phänomen wurde von Slaughter et al. erstmals als „field cancerization“ bezeichnet [Slaughter et al., 1953].

Durch die regional unterschiedlichen Risikofaktoren ergeben sich unweigerlich regionale Häufungen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Die weltweit höchsten Anteile sind in Melanesien (Papua-Neuguinea, Salomonen, Fidschi, Vanuatu, Westneuguinea, Neukaledonien und Torres-Strait-Inseln), im Süden Asiens, in Teilen Frankreichs und in Teilen Osteuropas und der ehemaligen

Sowjetunion zu beobachten [Denaro et al., 2014]. Weltweit betrachtet sind Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Oropharynx die häufigste Lokalisation dieser Tumorentität [Bose et al., 2013].

Das Überleben von Patienten mit Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich hat sich in den letzten Jahrzehnten nur geringfügig verbessert. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches werden nicht selten erst spät diagnostiziert. Üblicherweise präsentieren sich Patienten im Durchschnitt erst im Stadium III bis IV der Erkrankung und in 10 % der Fälle werden initial bereits Fernmetastasen festgestellt [Denaro et al., 2014]. Über 50 % der Patienten mit neu diagnostizierten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches entwickeln Rezidive und Patienten mit rezidivierenden oder metastasierten Plattenepithelkarzinomen haben ein medianes Überleben von unter einem Jahr [Denaro et al., 2014]. Insgesamt werden Überlebensraten von ca. 50 % beschrieben, die sich seit Jahren kaum verändern [Bose et al., 2013].

Neben der sich kaum verbessernden Prognose scheint auch die Häufigkeit von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches aufgrund der Verteilung auf zahlreiche involvierte und therapeutisch aktive Fachdisziplinen unterschätzt. Dies zeigt die Dringlichkeit und motiviert zu weiterer intensiver wissenschaftlicher Auseinandersetzung mit dieser Erkrankung, um durch umfassenderes Verständnis verbesserte oder neue Therapien zu ermöglichen.

Zur erleichterten Beschreibung der Ausbreitung von malignen Tumoren in Klinik und Forschung wurde die Klassifikation nach TNM eingeführt. Diese wird auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches angewendet.

2.2 Klassifikation nach TNM

Das TNM-System zur Klassifikation von malignen Tumoren ist ein weltweit verwendetes System zur eindeutigen Beschreibung der anatomischen Ausbreitung solider maligner Tumoren. Es erleichtert den Informationsaustausch, die Behandlungsplanung, die Einschätzung von Prognosen und die Auswertung von Behandlungsergebnissen in Klinik und Forschung [Wittekind and Meyer, 2010].

Bei der TNM-Klassifikation handelt es sich um eine Kurzschreibweise. Die Basis bilden die T-, N- und M-Kategorie. Die T-Kategorie beschreibt die Ausbreitung des Primärtumors. Es gibt Abstufungen von T0 bis T4. Die N-Kategorie bezieht sich auf das Ausmaß von möglichen Lymphknotenmetastasen mit Abstufungen von N0 bis N3. Mögliche Fernmetastasen werden durch die M-Kategorie klassifiziert. Die Existenz von Fernmetastasen wird mit M1 beschrieben, ansonsten wird bei nicht vorhandenen Fernmetastasen M0 klassifiziert (Tabelle 1, Seite 5). Dabei gibt es jeweils eine klinische (cTNM) und nach einer Resektion und histopathologischen Aufarbeitung eine pathologische (pTNM) Klassifikation. In Abhängigkeit der TNM-Klassifikation kann im Anschluss eine Einteilung in Stadiengruppierungen erfolgen.

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: M-Fernmetastasen nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Posttherapeutisch kann der Residualtumor mit der R-Klassifikation (Tabelle 2, Seite 5) beschrieben und nach histopathologischer Aufarbeitung der Differenzierungsgrad (Tabelle 3, Seite 6) angegeben werden. Die Angabe des Differenzierungsgrades wird als histopathologisches Grading bezeichnet.

RX	Das Vorhandensein des Resttumors kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopisch ist ein Residualtumor festzustellen
R2	Makroskopisch ist ein Residualtumor festzustellen

Tabelle 2: R-Residualtumor nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Tabelle 3: G-Histopathologisches Grading nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Es existieren außerdem weitere Abkürzungen zur genaueren Beschreibung bzw. weiteren Klassifikation. Die Lymphgefäßinvasion des Tumors wird mit der L-Kategorie, die Veneninvasion mit der V-Kategorie und die perineurale Invasion mit der Pn-Kategorie beschrieben. Zusätzliche Kennzeichen sind das Suffix „m“ für multiple Primärtumoren, das Präfix „y“ bei einer Klassifikation während oder nach initialer multimodaler Therapie, das Präfix „r“ bei der Beschreibung von Rezidivtumoren und der Buchstabe „a“ bei der Klassifikation im Rahmen einer Autopsie.

2.3 Klassifikation nach TNM bei Kopf- und Halstumoren

In der 7. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumoren [Wittekind and Meyer, 2010] werden unter Kopf- und Halstumoren die anatomischen Bezirke Lippen und Mundhöhle, Pharynx, Larynx, Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen, malignes Melanom des oberen Aerodigestivtraktes, große Speicheldrüsen und Schilddrüse klassifiziert. In dieser Arbeit über Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches sind dabei die Bezirke Lippen und Mundhöhle, Pharynx, Larynx und Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen relevant.

Die T-Klassifikation variiert zwischen den einzelnen anatomischen Bezirken und Unterbezirken, wohingegen die N-Klassifikation für alle hier im Folgenden beschriebenen Bezirke von Kopf-Halstumoren mit Ausnahme des Nasopharynx identisch ist:

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung

Tabelle 4: N-Regionäre Lymphknoten nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Die M-Klassifikation (Tabelle 1, Seite 5), wie auch die posttherapeutische Angabe des Residualtumors (Tabelle 2, Seite 5) und des histopathologischen Gradings (Tabelle 3, Seite 6) sind ohne Ausnahmen für alle im Folgenden beschriebenen anatomischen Bezirke identisch.

2.3.1 Lippen und Mundhöhle

Tabelle 5 zeigt die T-Klassifikation für maligne Tumoren im Bereich der Lippen und der Mundhöhle. Sind T-, N- und M-Stadium bekannt, kann eine Stadiengruppierung erfolgen (Tabelle 6, Seite 7).

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	Lippe: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, den N. alveolaris inferior, in Mundhöhlenboden oder in Haut (Kinn oder Nase)
T4a	Mundhöhle: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Lippe und Mundhöhle: Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 5: T-Primärtumor Lippen und Mundhöhle nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadium IVB	Jedes T	N3	M0
	T4b	Jedes N	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 6: Stadiengruppierung Lippen und Mundhöhle nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

2.3.2 Pharynx

Im Bereich des Pharynx wird zwischen Oro-, Naso- und Hypopharynx unterschieden. Die Lymphknotenmetastasierung im Bereich des Nasopharynx (Tabelle 9, Seite 7) wird als einzige Ausnahme der hier beschriebenen Tumorentitäten abweichend klassifiziert. Auch die Stadiengruppierung weicht im Bereich des Nasopharynx (Tabelle 12, Seite 8) von der des Oro- und Hypopharynx (Tabelle 11, Seite 8) ab.

Oropharynx:

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur linguale Oberfläche der Epiglottis
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 7: T-Primärtumor Oropharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Nasopharynx:

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf den Nasopharynx begrenzt oder mit Ausbreitung auf den Oropharynx und/oder Nasenhöhle
T2	Tumor mit parapharyngealer Ausbreitung
T3	Tumor infiltriert Knochenstrukturen der Schädelbasis und oder Nasennebenhöhlen
T4	Tumor mit intrakranieller Ausbreitung und/oder Befall von Hirnnerv(en), Fossa infratemporalis, Hypopharynx, Augenhöhle, Spatium masticatorium

Tabelle 8: T-Primärtumor Nasopharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Unilaterale Metastase(n) in Halslymphknoten und/oder uni- oder bilaterale Metastase(n) in retropharyngealen Lymphknoten kranial der Supraklavikulargrube, 6 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2	Metastase(n) in bilateralen Lymphknoten über der Supraklavikulargrube, 6 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N3a	Metastase(n) in Lymphknoten größer als 6 cm in größter Ausdehnung
N3b	Metastase(n) in Lymphknoten mit Ausdehnung in die Supraklavikulargrube

Tabelle 9: N-Regionäre Lymphknoten Nasopharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Hypopharynx:

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt und/oder 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Hypopharynx oder einen benachbarten Bezirk oder misst mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung, ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor misst mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder Tumor mit Fixation des Hemilarynx
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszien, umschließt die A. carotis interna oder infiltriert Strukturen des Mediastinums

Tabelle 10: T-Primärtumor Hypopharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Stadiengruppierung Oro- und Hypopharynx:

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadium IVB	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 11: Stadiengruppierung Oro- und Hypopharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Stadiengruppierung Nasopharynx:

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T1	N1	M0
	T2	N0, N1	M0
Stadium III	T1, T2	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	M0
Stadium IVA	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IVB	Jedes T	N3	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 12: Stadiengruppierung Nasopharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

2.3.3 Larynx

Im Bereich des Larynx wird zwischen Supraglottis, Glottis und Subglottis unterschieden. Die Stadiengruppierung (Tabelle 16, Seite 9) ist für alle drei Unterbezirke identisch.

Supraglottis:

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis begrenzt, mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
T2	Tumor infiltriert Schleimhaut von mehr als einem benachbarten Unterbezirk der Supraglottis oder Glottis oder eines Areals außerhalb der Supraglottis (z. B. Schleimhaut von Zungengrund, Vallecula, mediale Wand des Sinus piriformis), ohne Fixation des Larynx
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation, und/oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirks, des präepiglottischen Gewebes und/oder geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 13: T-Primärtumor Supraglottis nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Glottis:

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1a	Tumor auf eine Stimmlippe begrenzt (kann auch vordere oder hintere Kommissur befallen), mit normaler Beweglichkeit
T1b	Tumorbefall beider Stimmlippen (kann auch vordere oder hintere Kommissur befallen), mit normaler Beweglichkeit
T2	Tumor breitet sich auf Supraglottis und/oder Subglottis aus und/oder Tumor mit eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation und/oder Invasion der Postkrikoidgegend und/oder des präepiglottischen Gewebes und/oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 14: T-Primärtumor Glottis nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Subglottis:

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf Subglottis begrenzt
T2	Tumor breitet sich auf eine oder beide Stimmlippen aus, diese mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 15: T-Primärtumor Subglottis nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Stadiengruppierung Larynx:

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadium IVB	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 16: Stadiengruppierung Larynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

2.3.4 Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen

Im Bereich der Nasenhöhle und der Nasennebenhöhlen werden die Bezirke Kieferhöhle (Sinus maxillaris) und Nasenhöhle mit Siebbeinzellen (Sinus ethmoidalis) klassifiziert. Die Stadiengruppierung ist bei diesen beiden Bezirken identisch.

Kieferhöhle (Sinus maxillaris):

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf die antrale Schleimhaut begrenzt ohne Arrosion oder Destruktion des Knochens
T2	Tumor mit Arrosion oder Destruktion des Knochens (ausgenommen die posteriore Wand) einschließlich Ausdehnung auf harten Gaumen und/oder mittleren Nasengang
T3	Tumor infiltriert eine oder mehrere der folgenden Strukturen: Knochen der dorsalen Wand der Kieferhöhle, Subtange- gewebe, Boden oder mediale Wand der Orbita, Fossa pterygoidea, Sinus ethmoidalis
T4a	Tumor infiltriert eine oder mehrere der folgenden Strukturen: Inhalt der vorderen Orbita, Wangenhaut, Processus pterygoideus, Fossa infratemporalis, Lamina cribrosa, Keilbeinhöhle, Stirnhöhle
T4b	Tumor infiltriert eine oder mehrere der folgenden Strukturen: Orbitaspitze, Dura, Gehirn, mittlere Schädelgrube, Hirnnerven ausgenommen den maxillären Ast des N. trigeminus (V2), Nasopharynx, Clivus

Tabelle 17: T-Primärtumor Kieferhöhle Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Nasenhöhle und Siebbeinzellen (Sinus ethmoidalis):

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Nasenhöhle oder Siebbeinzellen beschränkt, mit oder ohne Arrosion des Knochens
T2	Tumor in zwei Unterbezirken eines Bezirkes oder Ausbreitung auf einen Nachbarbezirk innerhalb des Nasenhöhle-Siebbeinzellen-Areals, mit oder ohne Arrosion des Knochens
T3	Tumor breitet sich in die mediale Orbita oder den Orbitaboden oder in Kieferhöhle, harten Gaumen oder Lamina cribrosa aus
T4a	Tumor infiltriert eine oder mehrere der folgenden Strukturen: Inhalt der vorderen Orbita, Haut von Nase oder Wange, minimale Ausbreitung in vordere Schädelgrube, Processus pterygoideus, Keilbeinhöhle oder Stirnhöhle
T4b	Tumor infiltriert eine oder mehrere der folgenden Strukturen: Orbitaspitze, Dura, Gehirn, mittlere Schädelgrube, Hirnnerven ausgenommen den maxillären Ast des N. trigeminus (V2), Nasopharynx, Clivus

Tabelle 18: T-Primärtumor Nasenhöhle und Siebbeinzellen nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

Stadiengruppierung Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen:

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadium IVB	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 19: Stadiengruppierung Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].

2.3.5 Hinweis auf Neuerungen der TNM-Klassifikation

Diese Arbeit wurde während der Gültigkeit der 7. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumoren durchgeführt. Seit 01. Januar 2017 ist die 8. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumoren gültig [Wittekind, 2016]. In der neuen Auflage wurde auch das Kapitel über Kopf- und Halstumoren überarbeitet [Doescher et al., 2017].

Insbesondere wurde das Kapitel über oropharyngeale Malignome wesentlich modifiziert. Durch die hohe prognostische Relevanz des HPV-Status bei Oropharynxkarzinomen begründet, wurde dieser in die Klassifikation mit aufgenommen. Im Speziellen wurde p16 als Surrogatmarker für den HPV-Status [Jouhi et al., 2017] in die Klassifikation integriert. Es wird nun die Testung aller neu diagnostizierten Oropharynx Tumoren auf p16 empfohlen und es existiert eine neue T- und N-Klassifikation p16-positiver Oropharynx Tumoren, die sich von p16-negativen Oropharynx Tumoren deutlich unterscheidet.

Des Weiteren wurde das prognostisch relevante und therapiewegweisende kapselüberschreitende Wachstum von Lymphknotenmetastasen im Kopf-Hals-Bereich direkt in die N-Klassifikation aufgenommen.

Im Bereich der Mundhöhle wird in der 8. Auflage nun der Invasionstiefe des Primärtumors bei Mundhöhlenkarzinomen Beachtung geschenkt. So fließt diese in die neue T-Klassifikation mit ein und es wird nicht mehr nur die größte Ausdehnung zur Klassifikation herangezogen.

Schließlich wurde noch ein Kapitel für Hauttumoren im Kopf-Hals-Bereich ergänzt.

2.4 Therapie und Prognose von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches

Die Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches gestaltet sich in Abhängigkeit von Größe und Ausbreitung sehr komplex. Frühe Stadien können im Allgemeinen mit einer Therapiemodalität behandelt werden, wobei in fortgeschrittenen Fällen meist multimodale und interdisziplinäre Konzepte angewendet werden müssen.

Zur Therapie stehen chirurgische Maßnahmen, Radiotherapie und Chemo- bzw. Systemtherapie zur Verfügung. Grundsätzlich werden in frühen Stadien eher chirurgische Maßnahmen oder die Radiotherapie eingesetzt. In lokal fortgeschrittenen Stadien oder in rezidivierten und metastasierten Stadien der Erkrankung wird die Systemtherapie ergänzt. Die obersten Ziele jeder Therapie sind dabei, das Karzinom vollständig zu entfernen, die Funktion möglichst zu bewahren bzw. wiederherzustellen und die Lebensqualität des Patienten zu erhalten oder zu verbessern [Denaro et al., 2014].

2.4.1 Therapie im Frühstadium

Frühstadien von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle werden meist, aufgrund ihrer guten chirurgischen Zugänglichkeit und der geringeren Strahlensensibilität, chirurgisch saniert. Im Bereich des

Oro-, Hypopharynx und Larynx hingegen, sind chirurgische Ansätze und die Radiotherapie oft gleichwertig. Frühstadien von Plattenepithelkarzinomen des Nasopharynx wiederum werden ausschließlich mittels Radiochemotherapie behandelt [Denaro et al., 2014].

2.4.2 Therapie im lokal fortgeschrittenen Stadium

In lokal fortgeschrittenen Stadien sind multimodale Therapien und damit die interdisziplinäre Zusammenarbeit erforderlich. Die chirurgischen Maßnahmen und die Radiotherapie werden durch Systemtherapien ergänzt. Neben chirurgischen Konzepten mit adjuvanten Therapien wird die kombinierte Radiochemotherapie als Standard angesehen. Der Goldstandard ist dabei die Kombination von drei Zyklen einer platinhaltigen Chemotherapie mit einer fraktionierten Bestrahlung. Ist der Allgemeinzustand der Patienten hierfür nicht ausreichend gut, so werden spezielle, rein strahlentherapeutische Ansätze oder Radiotherapien in Kombination mit dem monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab (Handelsname Erbitux[®], Merck, Darmstadt, Deutschland) oder weniger belastenden Chemotherapeutika angewendet [Denaro et al., 2014].

In lokal fortgeschrittenen Stadien stellt sich der Organ- bzw. Funktionserhalt entsprechend schwieriger dar. In fortgeschrittenen Stadien bedeutet ein operatives Vorgehen im Bereich des Larynx häufig die totale Laryngektomie. Bis vor ca. 25 Jahren war die totale Laryngektomie in Kombination mit einer postoperativen Bestrahlung die Standardtherapie des lokal fortgeschrittenen Larynxkarzinoms. Nachdem Untersuchungen bei selektierten Patienten mit lokal fortgeschrittenen Larynxkarzinomen nach Kombinationen von Chemo- und Radiotherapie vergleichbare Ergebnisse bzgl. des Überlebens wie nach einer klassischen Laryngektomie mit postoperativer Bestrahlung zeigen konnten [Denaro et al., 2014, Lefebvre et al., 1996, Wolf et al., 1991], wurden inzwischen zunehmend Strategien entwickelt, die einen Organerhalt ermöglichen. Ob die nichtoperativen Strategien gleichwertig sind wird jedoch durch andere Studien in Frage gestellt, die ein signifikant besseres Überleben nach einer Laryngektomie konstatieren [Denaro et al., 2014, Richard et al., 1998]. So bleibt die Therapie in lokal fortgeschrittenen Stadien des Larynxkarzinoms oft eine Einzelfallentscheidung. Sicher scheint jedoch, dass zum aktuellen Zeitpunkt bei T4 Larynxkarzinomen die totale Laryngektomie überlegen und damit indiziert ist [Bhattacharyya and Kainickal, 2018, Britt and Gourin, 2017, Chen and Halpern, 2007].

Eine entscheidende Rolle spielen im lokal fortgeschrittenen Stadium adjuvante Therapien. Nach chirurgischem Vorgehen ist aufgrund des hohen Rezidivrisikos üblicherweise eine adjuvante Therapie erforderlich. Die Radiotherapie als alleinige adjuvante Therapie ist allerdings nur bei Patienten mit niedrigem Risiko sinnvoll. Die Ergänzung einer Chemotherapie zur adjuvanten Radiotherapie in Form einer kombinierten Radiochemotherapie ist bei Patienten mit hohem Risiko der alleinigen adjuvanten Radiotherapie überlegen. Erklärt wird dieser Effekt unter anderem auch durch die strahlensensibilisierende Wirkung der Chemotherapie im Rahmen der kombinierten Radiochemotherapie [Denaro et al., 2014].

Generell haben Radiotherapie und Chemotherapie bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ihre Bedeutung neben der definitiven Therapie nur in der adjuvanten Therapie und kaum in neoadjuvanten Ansätzen. Neoadjuvante Konzepte konnten bisher keinen Vorteil zeigen. Adjuvante Bestrahlungskonzepte reduzieren im Vergleich zu neoadjuvanten Konzepten das Lokalrezidivrisiko deutlich [Tupchong et al., 1991]. Neoadjuvante Chemotherapien als Induktionstherapien werden nur nach Einzelfallentscheidungen eingesetzt. Ein zusätzlicher Nutzen einer neoadjuvanten Chemotherapie vor einer kombinierten Radiochemotherapie konnte bislang nicht nachgewiesen werden [Budach et al., 2016, Cohen et al., 2014, Haddad et al., 2013, Hitt et al., 2014, Pignon et al., 2009]. Zu beachten ist auch, dass eine zusätzliche adjuvante reine Chemotherapie nach einer bereits erfolgten kombinierten Radiochemotherapie, aber auch nach einer adjuvanten alleinigen Radiotherapie, keinen Überlebensvorteil bringt und daher nicht empfohlen wird [Pignon et al., 2009].

2.4.3 Neck Dissection

Zur Kontrolle von potenziellen oder manifesten Lymphknotenmetastasen bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches kommt unter anderem die zervikale Lymphadenektomie (engl. Neck Dissection) zur Anwendung. Hierbei werden zervikale Lymphknoten in mehr oder weniger radikaler bzw. umfangreicher Weise chirurgisch entfernt. Eine Neck Dissection kann dabei jeweils einseitig oder bei Überschreiten der Mittellinie durch den Tumor auch beidseitig erfolgen. Auch sogenannte Mittellinientumoren wie Zungen-, Zungengrund-, Supraglottis-, Weichgaumen- oder Uvulakarzinome erfordern eine beidseitige Neck Dissection [Mast, 2014]. Bei einer beidseitigen Neck Dissection sind hierbei der Radikalität Grenzen gesetzt, da bestimmte Strukturen, wie beispielsweise die Arteria carotis, nur einseitig entfernt werden können.

Eine solche Neck Dissection hat dabei sowohl therapeutische als auch, im Rahmen der histopathologischen Aufarbeitung, diagnostische Funktion. So werden bei 15 bis 50 % der Patienten [Byers et al., 1998, Mast, 2014], die klinisch als frei von zervikalen Lymphknoten galten (cN0), in der histopathologischen Aufarbeitung des Neck Dissection-Präparats, Lymphknotenmetastasen festgestellt (pN+).

In Bezug auf die Radikalität der Neck Dissection unterscheidet man mehrere Formen. Bei einer radikalen Neck Dissection werden alle Lymphknoten in den Lymphknotenkompartimenten I bis V sowie nicht-lymphatischen Strukturen wie die Vena jugularis interna, der Musculus sternocleidomastoideus und der Nervus accessorius (Nervus XI) entfernt. Eine noch umfangreichere Neck Dissection bezeichnet man als extendierte oder erweiterte radikale Neck Dissection. Hierbei werden zusätzliche Strukturen, wie beispielsweise okzipitale Lymphknoten oder zusätzliche nicht-lymphatische Strukturen, wie beispielsweise die Arteria carotis, reseziert.

Diese radikalen Konzepte der Neck Dissection wurden früher standardmäßig durchgeführt, kommen aber heutzutage nur noch in seltenen Ausnahmefällen zur Anwendung und gelten daher als historisch. Heute werden zunehmend weniger radikale und selektivere Verfahren eingesetzt.

So wird bei einer sogenannten modifiziert radikalen Neck Dissection im Vergleich zur radikalen Neck Dissection mindestens eine der drei genannten nicht-lymphatischen Strukturen belassen. Dieses Verfahren wird heute bei manifesten Lymphknotenmetastasen eingesetzt, da gezeigt werden konnte, dass die radikale Neck Dissection keinen Überlebensvorteil im Vergleich zu dieser modifiziert radikalen Neck Dissection, jedoch erhebliche Einschränkungen der Lebensqualität mit sich bringt [Jesse et al., 1978].

Als selektive Neck Dissection bezeichnet man eine Ausräumung von lediglich lymphatischen Strukturen in bestimmten Lymphknotenkompartimenten. Dies wird standardmäßig bei klinisch nicht nachweisbaren Lymphknotenmetastasen (cN0) angewendet [Weiss et al., 1994]. Bei Mundhöhlenkarzinomen wird beispielsweise nur die Ausräumung der Lymphknotenkompartimente I, II und III empfohlen [Shah et al., 1990]. Es wird lediglich bei Zungenkarzinomen die zusätzliche Ausräumung des Lymphknotenkompartiments IV ergänzt, da hier in vermehrter Häufigkeit Metastasen festgestellt wurden [Byers et al., 1997].

Eine selektive Neck Dissection wird allerdings nicht nur beim klinisch unauffälligen Hals (cN0), sondern zunehmend auch bei bereits klinisch nachweisbaren Lymphknotenmetastasen angewendet. Man geht mittlerweile davon aus, dass eine selektive Neck Dissection bei cN1 Lymphknotenstatus eine adäquate Therapie sein kann. Auch bei cN2 Lymphknotenstatus kann man bei nicht fixierten Lymphknoten, fehlenden tastbaren Lymphknoten in den Lymphknotenleveln IV und V, sowie bei Lymphknoten unter 3 cm und nicht vorhandenen multiplen Lymphknoten in mehreren Lymphknotenleveln eine selektive Neck Dissection durchführen [Rodrigo et al., 2018].

2.4.4 Therapie des rezidierten oder fernmetastasierten Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches

Als Erstlinientherapie beim rezidierten oder metastasierten Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches wird eine auf Platin basierende Kombinationstherapie mit zusätzlich 5-Fluorouracil und Cetuximab eingesetzt. Laut Vermorken et al. erhöht das Ergänzen des monoklonalen EGFR-Antikörpers Cetuximab jeweils signifikant das Gesamtüberleben von 7,4 auf 10,1 Monate, das progressionsfreie Überleben von 3,3 auf 5,6 Monate und das Therapieansprechen von 20 % auf 36 % [Vermorken et al., 2008]. Auf diese Kombinationstherapie lässt man eine Erhaltungstherapie mit Cetuximab folgen [Argiris et al., 2017].

Eine definierte Zweitlinientherapie existiert nicht [Argiris et al., 2008, Denaro et al., 2014]. Es stehen allerdings, wie auch für Patienten in reduziertem Allgemeinzustand, weniger intensive Monotherapien bei Versagen der Erstlinientherapie zur Verfügung. Hierbei stehen Substanzen wie Taxane, 5-Fluorouracil, Methotrexat oder Vinorebelin zur Verfügung [Mast, 2014]. Ab der Zweitlinientherapie werden, wie bei reduziertem Allgemeinzustand des Patienten, Monotherapien eingesetzt, da Kombinationstherapien allenfalls das Ansprechen, nicht aber das Gesamtüberleben verbessern können [Argiris et al., 2008, Mast, 2014].

Neuerdings stehen zudem Immun-Checkpoint-Inhibitoren bei Versagen der Erstlinientherapie und für Patienten in reduziertem Allgemeinzustand zur Verfügung [Argiris et al., 2017].

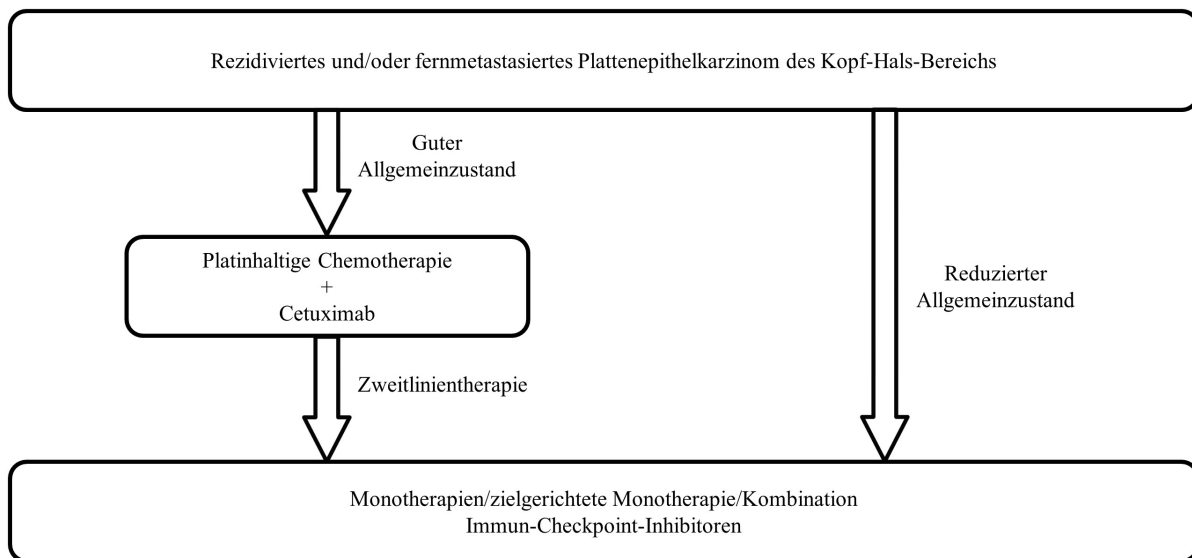


Abbildung 1: Therapie des rezidierten oder fernmetastasierten Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches; modifiziert nach Argiris et al. [Argiris et al., 2017].

2.4.5 Zielgerichtete Therapien

Neben dem bereits im Rahmen der Erstlinientherapie eingesetzten monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab existieren zahlreiche weitere Ansätze der zielgerichteten Therapie. Es existieren unter anderem weitere EGFR-Antikörper, Tyrosinkinase-Inhibitoren und Immun-Checkpoint-Inhibitoren.

Für den EGFR-Antikörper Panitumumab (Handelsname Vectibix[®], Amgen, Thousand Oaks, USA) konnte, im Gegensatz zu Cetuximab, bisher kein signifikanter Überlebensvorteil bei Ergänzung zu einer platinhaltigen Chemotherapie und 5-Fluorouracil gezeigt werden [Mast, 2014, Vermorken et al., 2013]. Es wird vermutet, dass der IgG1 Antikörper, im Gegensatz zu dem IgG2 Antikörper Cetuximab, die antikörpervermittelte zelluläre zytotoxische Immunreaktion nur in geringem Maße auslöst. Da diese Immunreaktion bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, im Gegensatz zu

beispielsweise kolorektalen Karzinomen, sehr relevant zu sein scheint, könnte dies ein Grund für den mangelnden Vorteil von Panitumumab bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches sein [Argiris et al., 2017]. Es liegt keine Zulassung für Panitumumab in der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches vor. Bei kolorektalen Karzinomen hingegen kommt sowohl Cetuximab als auch Panitumumab zum Einsatz, sofern keine entsprechenden KRAS-Mutationen vorhanden sind [Stintzing, 2014].

Auch Tyrosinkinase-Inhibitoren konnten bisher keinen Einzug in die klinische Anwendung finden. Weder EGFR-Kinase-Inhibitoren wie Erlotinib (Handelsname Tarceva[®], Roche, Basel, Schweiz), Gefitinib (Handelsname Iressa[®], AstraZeneca, London, Vereinigtes Königreich) oder Afatinib (Handelsname Giotrif[®], Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland), noch Multi-Kinase-Inhibitoren wie Vandetanib (Handelsname Caprelsa[®], AstraZeneca, London, Vereinigtes Königreich) konnten in klinischen Studien entsprechende Wirksamkeit zeigen. Bisher sind daher keine Kinase-Inhibitoren im klinischen Einsatz [Denaro et al., 2014].

Ein relativ neuer Therapieansatz sind sogenannte Immun-Checkpoint-Inhibitoren. Es existieren programmed cell death protein 1- (PD-1-), programmed cell death protein 1 corresponding ligand- (PD-L1-) und cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)-Antikörper. Diese führen durch Hemmung immunsuppressiver Rezeptoren bzw. deren Liganden zu einer Immunmodulation im Sinne einer Aktivierung von T-Lymphozyten und somit zu einer antitumoralen Aktivität dieser. Im Speziellen sind hierbei die blockierenden PD-1-Antikörper Nivolumab (Handelsname Opdivo[®], Bristol-Myers Squibb, New York City, USA) und Pembrolizumab (Handelsname Keytruda[®], MSD, Kenilworth, USA) zu nennen. Es existieren Zulassungen für Nivolumab beim rezidivierten und metastasierten Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches. Auch für Pembrolizumab gibt es bereits eine Zulassung durch die US Food and Drug Administration (FDA) [Argiris et al., 2017].

2.5 Molekulare Grundlagen

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches sind eine heterogene Erkrankung mit komplexen molekularen Veränderungen. Wie bei allen Karzinomen spricht man bei molekulargenetischen Veränderungen oft von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen und den entsprechenden Onkoproteinen und Tumorsuppressorproteinen. Onkogene sind dabei Gene, die bei einer Aktivierung durch eine Mutation zu einem persistierenden Wachstumsvorteil der Zelle führen [Vogelstein et al., 2013]. Tumorsuppressorgene hingegen sind Gene, die bei einer Inaktivierung durch entsprechende Mutationen zu einem solchen Wachstumsvorteil führen [Vogelstein et al., 2013]. Dieser Wachstumsvorteil kann letztlich zur Entstehung von Karzinomen beitragen.

Als Beispiel für ein Tumorsuppressorgen ist TP53 zu nennen. Das entsprechende Protein p53 ist eines der bedeutendsten Tumorsuppressorproteine [Poeta et al., 2007]. Es ist bei exogenem Stress und bei DNA-Veränderungen unter anderem an der Unterbrechung des Zellzyklus [Giono and Manfredi, 2006] und an der Apoptose [Haupt et al., 2003, Poeta et al., 2007] beteiligt und minimiert damit das Risiko der Entstehung von entarteten Zellen. Bei einem Funktionsverlust fällt dieser wachstumshemmende Effekt weg. Somit ist TP53 ein klassisches Tumorsuppressorgen bzw. p53 ein klassisches Tumorsuppressorprotein. Der Funktionsverlust von TP53 bzw. p53 ist eine der häufigsten Veränderungen, die in Krebszellen beobachtet werden [Gasco and Crook, 2003, Guimaraes and Hainaut, 2002]. Dieser Funktionsverlust kann durch verschiedenste Veränderungen wie Mutationen im TP53-Gen [Olshan et al., 1997], durch Verlust der Heterozygotie [Gonzalez et al., 1995] oder durch Einfluss von viralen Proteinen bedingt sein [Scheffner et al., 1990]. Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches sind TP53-Mutationen in mehr als 40 % der Fälle nachweisbar [Poeta et al., 2007]. TP53-Mutationen sind dabei mit einem schlechteren Überleben assoziiert, wobei man zwischen sogenannten „disruptive“ und „nondisruptive“ Mutationen unterscheiden kann. Insbesondere „disruptive“ Mutatio-

nen, die mit einer ausgeprägteren Störung der Proteinstruktur einhergehen, sind signifikant mit einem schlechteren Überleben assoziiert [Poeta et al., 2007].

Das wohl bedeutendste Onkogen, insbesondere auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, ist der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Der für das Wachstum von Zellen essenzielle Rezeptor kann bei entsprechenden Veränderungen zu einem übermäßigen Wachstumsvorteil führen.

Im Allgemeinen geht man davon aus, dass zur Karzinomentstehung zumeist mehrere Mutationen nötig sind. Bei Mutationen in Karzinomzellen spricht man von sogenannten Passenger- und Driver-Mutationen. Passenger-Mutationen sind dabei lediglich vorhandene Mutationen, die allerdings keinen direkten oder indirekten Wachstumsvorteil bedingen. Driver-Mutationen hingegen bedingen einen solchen Wachstumsvorteil [Vogelstein et al., 2013]. Entsprechend dieser Nomenklatur wird statt von Onkogenen und Tumorsuppressorgen zunehmend von Driver-Genen gesprochen.

Durch Genomsequenzierung konnte man zeigen, dass bei soliden Karzinomen durchschnittlich ungefähr 33 bis 66 Mutationen mit konsekutiven Proteinveränderungen vorhanden sind [Vogelstein et al., 2013]. Teilweise gibt es für bestimmte Karzinome sehr charakteristische Mutationen und Mutationssequenzen. Ein bekanntes Beispiel ist die Adenom-Karzinom-Sequenz bei kolorektalen Karzinomen. Es werden klar definierte klinische und histopathologische Stadien durchlaufen, die jeweils mit spezifischen genetischen Veränderungen korrelieren und letztlich zur Karzinomentstehung führen [Fearon and Vogelstein, 1990, Vogelstein et al., 1988].

Auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches existiert ein solches Modell. Das Tumorprogressionsmodell nach Califano et al. [Califano et al., 1996], welches 2006 durch Perez-Ordoñez et al. [Perez-Ordonez et al., 2006] weiterentwickelt wurde, beschreibt eine Abfolge und Akkumulation von genetischen Veränderungen, die zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches führen (Abbildung 2, Seite 15).

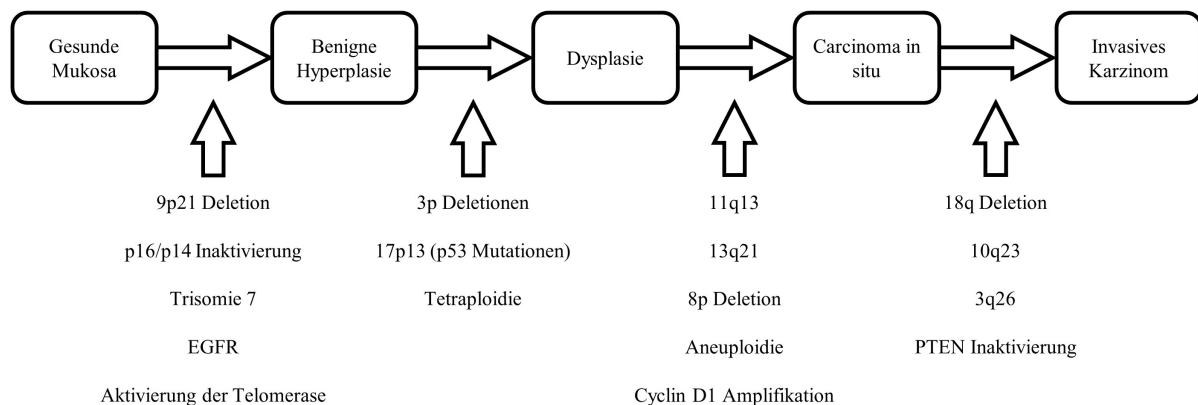


Abbildung 2: Tumorprogressionsmodell; modifiziert nach Perez-Ordoñez et al. [Perez-Ordonez et al., 2006]; basierend auf Califano et al. [Califano et al., 1996].

Das wachsende Verständnis der Molekulargenetik von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches lässt hoffen, dass zunehmend bessere und gezieltere Therapien möglich werden. Die gezielte Therapie mit dem Onkoprotein EGFR als Ansatzpunkt ist, wie beschrieben, in fortgeschrittenen Fällen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches bereits Teil der Erstlinientherapie.

2.5.1 Epidermal Growth Factor Receptor und dessen Bedeutung in der zielgerichteten Tumortherapie

Der Epidermal Growth Factor Receptor (kurz EGFR; auch bekannt unter ErbB1 oder HER1) ist eine sogenannte Rezeptortyrosinkinase mit einer absoluten Molekülmasse von 170 kDa [Ang et al., 2002]. EGFR ist auf Chromosom 7p12 kodiert [Ang et al., 2002] und wird zur Rezeptorfamilie der Erythroblastosis oncogene B (ErbB) Rezeptortyrosinkinasen, welche auch die Bezeichnung Human Epidermal Growth Factor Receptors (HER) tragen, gezählt. Die Bezeichnung Erythroblastosis oncogene B (ErbB) ist bedingt durch die Homologie von EGFR und dem retroviralen Protein v-ErbB des Erythroblastosevirus, das zur Entartung von Zellen in Geflügeltieren führen kann. Aufgrund dieser Eigenschaft des Proteins v-ErbB wurde EGFR ursprünglich erstmals als Onkogen identifiziert [Arteaga and Engelman, 2014]. Bei v-ErbB handelt es sich im Speziellen um ein sich selbst aktivierendes membranständiges Onkogen, das durch eine Deletion entsteht, die zum Verlust von großen Teilen der extrazellulären Domäne führt [Gan et al., 2013].

Weitere Vertreter der ErbB Rezeptorfamilie sind neben EGFR die Rezeptoren ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Alle Vertreter dieser Rezeptorfamilie sind membranständig und bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne. Bis auf ErbB2 können alle ErbB Rezeptortyrosinkinasen an ihrer extrazellulären Domäne Liganden binden, warum auch die Bezeichnung Liganden-bindende Domäne gebräuchlich ist. Solche Liganden sind unter anderem der Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming growth factor alpha ($TGF\alpha$), Amphiregulin (AREG), Epiregulin (EPR), Betacellulin oder Epigen [Thorne et al., 2016]. Durch die Bindung von Liganden, wie beispielsweise EGF, kommt es durch Konformationsänderungen zur Freilegung der Dimerisierungsregion der extrazellulären Domäne der Rezeptortyrosinkinase, wodurch eine Dimerisierung ermöglicht wird. Im Rahmen der Dimerisierung aktiviert sich die autoinhibierte Kinase der intrazellulären Domäne. Die Kinase folgt dabei dem Funktionsprinzip von Cyclin-abhängigen Kinasen (engl. cyclin-dependent kinases, CDKs). Die Funktion des aktivierenden Cyclins übernimmt der entsprechende Dimerisierungspartner [Zhang et al., 2006]. Dabei ist sowohl eine sogenannte Homodimerisierung als auch eine Heterodimerisierung möglich. Bei einer Heterodimerisierung verbinden sich zwei unterschiedliche Rezeptortyrosinkinasen der ErbB Rezeptorfamilie. Eine Heterodimerisierung ist auch mit ErbB2 möglich, obwohl dieser extrazellulär keine Liganden binden kann.

Die aktivierte Kinase der Rezeptortyrosinkinasen führt zur Phosphorylierung von Tyrosinen der intrazellulären Domänen. Durch diese Phosphorylierung werden nachgeschaltete Signalwege aktiviert. Bedeutende Signalwege sind dabei unter anderem der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Proteinkinase B (PKB/AKT) Signalweg, der Rat sarcoma protein (RAS)/Rapidly accelerated fibrosarcoma (RAF)/MEK/Mitogen activated protein kinase (MAPK) Signalweg, der Janus kinase (JAK)/ Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) Signalweg und der Phospholipase C γ (PLC γ)/ Proteinkinase C (PKC) Signalweg [Arteaga, 2002, Gan et al., 2013, Han and Lo, 2012, Mishra et al., 2017, Yarden and Sliwkowski, 2001]. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der Hauptsignalwege.

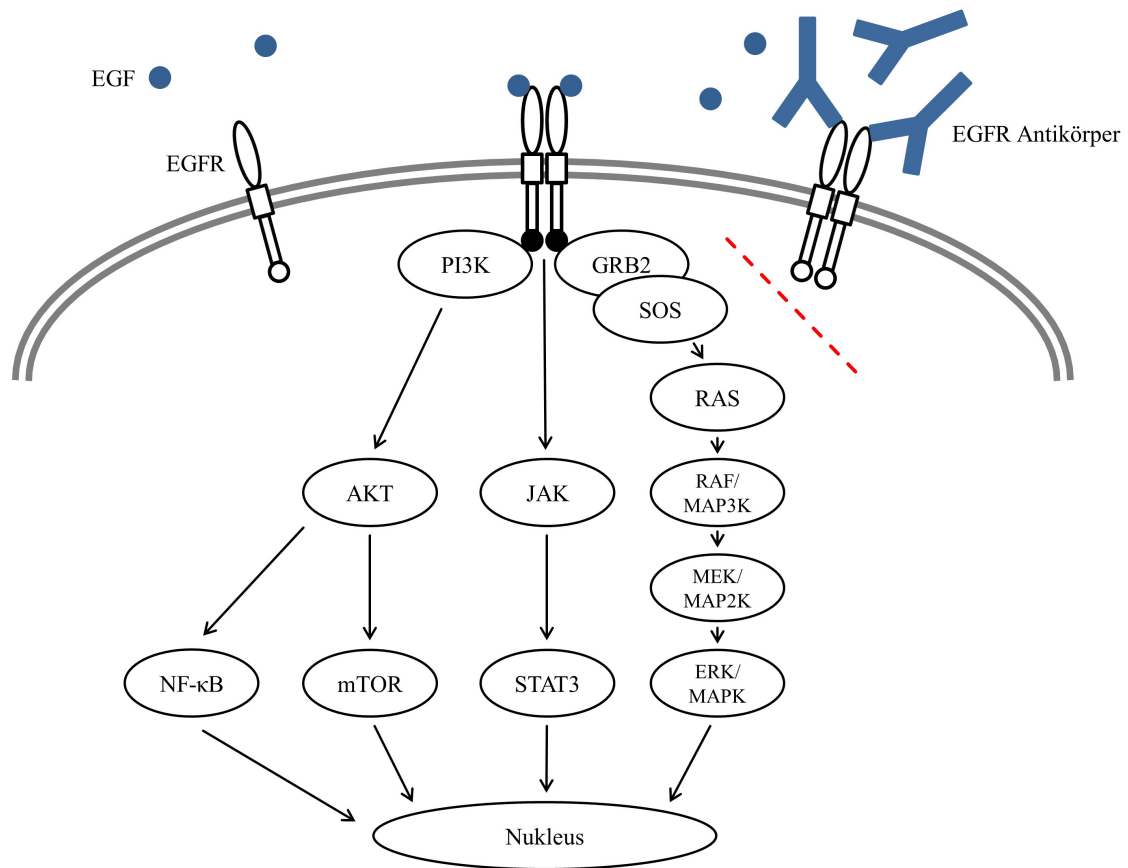


Abbildung 3: EGFR (links); Aktivierung von EGFR durch Dimerisierung nach Ligandenbindung und nachgeschaltete Signalwege (Mitte); Einfluss von EGFR-Antikörpern (rechts); modifiziert nach Martinez-Useros et al. [Martinez-Useros and Garcia-Foncillas, 2015], Sharafinski et al. [Sharafinski et al., 2010] und Gan et al. [Gan et al., 2013].

Der Epidermal Growth Factor Receptor im Speziellen zählt als zentraler Regulator des Wachstums von Zellen und als bedeutendes Onkogen. Die genannten nachgeschalteten Signalwege bedingen unter anderem die Proliferation und Migration der Zellen, hemmen die Apoptose und fördern die Angiogenese [Arteaga, 2002, Han and Lo, 2012, Mishra et al., 2017]. Diese Zellregulation durch EGFR ist in entarteten Zellen häufig durch diverse Veränderungen des Rezeptors gestört. Neben anderen Formen der Dysregulation, wie z.B. autokriner Aktivierung oder spezieller Mutationen, spielt die Überexpression von EGFR eine bedeutende Rolle. Speziell bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches kann eine EGFR-Überexpression in bis zu 90 % [Ling et al., 2018, Martinez-Useros and Garcia-Foncillas, 2015, Wheeler et al., 2015] der Fälle beobachtet werden. Eine EGFR-Überexpression wird dabei mit erhöhtem Tumorwachstum, verstärkter Metastasierung [Sok et al., 2006] und mit Chemo- und Strahlentherapieresistenz [Ang et al., 2002, Fung and Grandis, 2010, Martinez-Useros and Garcia-Foncillas, 2015] und somit mit einer schlechteren Prognose [Arteaga, 2002, Ling et al., 2018, Martinez-Useros and Garcia-Foncillas, 2015, Wheeler et al., 2015] der Erkrankung assoziiert. Häufig ist diese Überexpression eine Folge von Genamplifikation, aber auch p53 Dysregulationen werden als Ursache beschrieben [Grandis et al., 1998, Martinez-Useros and Garcia-Foncillas, 2015], wobei eine Genamplifikation bei 10 bis 20 % [Wheeler et al., 2015] aller Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches beobachtet wird. Bei Glioblastomen, den häufigsten hirneigenen bösartigen Tumoren, welche in dieser Arbeit als Referenzgewebe verwendet wurden, werden deutlich höhere EGFR-Genamplifikationsraten beschrieben. Man geht bei Glioblastomen von 34 bis 63 % aus [Felsberg et al., 2017, Gan et al., 2013].

Die große Bedeutung von EGFR, nicht nur bei Kopf-Hals-Tumoren oder Glioblastomen, sondern bei bösartigen Tumoren im Allgemeinen, hat zur Entwicklung von Medikamenten, die an diesem Rezeptor angreifen, geführt. Hierunter fallen Tyrosinkinase-Inhibitoren und monoklonale Antikörper. Bei der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches wird dabei, wie beschrieben, unter bestimmten Bedingungen der bereits erwähnte monoklonale Antikörper Cetuximab (Handelsname Erbitux[®], Merck, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt.

Cetuximab ist ein humanisierter monoklonaler muriner IgG1 Antikörper gegen EGFR. Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches war Cetuximab die erste zugelassene zielgerichtete Therapie [Argiris et al., 2017]. Basierend auf Ergebnissen einer Studie von Bonner et al. aus dem Jahr 2006 [Bonner et al., 2006], wird die Therapie mit Cetuximab dabei im lokal fortgeschrittenen Stadium in Kombination mit einer Strahlentherapie angewendet. In dieser Studie wurde ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber einer alleinigen Strahlentherapie gezeigt. Nach zahlreichen Studien, die ein verbessertes Outcome bei rezidierten, metastasierten oder rezidierten und metastasierten Plattenepithelkarzinomen zeigen konnten [Baselga et al., 2005, Burtneß et al., 2005, Herbst et al., 2005, Vermorken et al., 2008, Vermorken et al., 2007], ist der Einsatz von Cetuximab auch hier möglich und im Rahmen der Erstlinientherapie etabliert. Dabei ist Cetuximab in Kombination mit einer platinhaltigen Chemotherapie oder bei platinrefraktären Plattenepithelkarzinomen als Monotherapie zugelassen [Chau and Hammerman, 2016].

Durch die spezifische Bindung von Cetuximab an EGFR kommt es durch mehrere Mechanismen zu einer reduzierten Aktivität des Rezeptors und dadurch, entsprechend der eigentlichen Funktion des Rezeptors und der nachgeschalteten Signalwege, beispielsweise zu reduzierter Proliferation.

Ein Mechanismus ist die kompetitive Hemmung des Rezeptors durch Cetuximab. Die EGFR-Aktivierung durch beispielsweise den Epidermal Growth Factor (EGF) oder durch den transforming growth factor alpha (TGF α) wird durch diesen monoklonalen Antikörper geblockt [Mendelsohn and Baselga, 2003]. Es kommt somit zu einer reduzierten ligandenabhängigen Dimerisierung, Autophosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors. Außerdem wird beschrieben, dass eine Bindung von Cetuximab zu einer verstärkten Internalisierung von EGFR und somit zur Reduktion von EGFR an der Zelloberfläche führt [Arteaga, 2002, Li et al., 2005, Mendelsohn and Baselga, 2003]. Im Gegensatz zu internalisierten Komplexen von EGFR und EGF, scheinen internalisierte Komplexe von EGFR und Cetuximab bei niedrigen pH-Werten in Endosomen nicht zu dissoziieren, was einen lysosomalen Abbau zur Folge hat [Li et al., 2005]. Als weiterer Mechanismus spielen immunologische Prozesse eine entscheidende Rolle. Es kommt durch spezifisch gebundene EGFR-Antikörper zu einer antikörpervermittelten zellulären zytotoxischen Reaktion, unter anderem durch natürliche Killerzellen des Körpers. Zudem werden die Tumorzellen nach Opsonierung durch EGFR-Antikörper durch Antigenpräsentierende Zellen prozessiert, was im Verlauf eine antigenspezifische zytotoxische Reaktion durch CD8-positive T-Zellen ermöglicht [Argiris et al., 2017, Ling et al., 2018]. Diese antikörpervermittelte zelluläre zytotoxische Reaktion scheint insbesondere bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches relevant zu sein. Dies zeigt sich im Vergleich von Cetuximab und Panitumumab. Panitumumab ist ein weiterer monoklonaler EGFR-Antikörper, der eine geringere Wirksamkeit bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches zeigt. Es handelt sich um einen IgG2 Antikörper, der eine geringere antikörpervermittelte zelluläre zytotoxische Reaktion bedingt. Durch diese geringere immunologische Aktivierung lässt sich die geringere Wirksamkeit von Panitumumab im Vergleich zu Cetuximab sowohl als Monotherapie [Rischin et al., 2016] als auch in Kombinationstherapien [Vermorken et al., 2013] bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches erklären. Bei kolorektalen Karzinomen beispielsweise scheint dieser Effekt hingegen nicht so entscheidend zu sein [Argiris et al., 2017]. Hier zeigt Panitumumab vergleichbare Wirksamkeit wie Cetuximab und ist entsprechend für den klinischen Einsatz zugelassen [Price et al., 2014].

Problematisch ist, dass nur ein Teil der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, die eine Therapie mit Cetuximab erhalten, davon profitieren [Chau and Hammerman, 2016, Vermorken et al., 2007], wohingegen alle den potenziellen Nebenwirkungen ausgesetzt sind. Der zugrunde liegende Mechanismus für dieses Phänomen ist bislang nicht geklärt und es gibt somit auch keine verlässlichen Prädiktoren für das Ansprechen auf Cetuximab bei dieser Erkrankung. Das Ansprechen von Cetuximab korreliert nicht mit der EGFR-Genamplifikation oder EGFR-Proteinexpression [Melchers et al., 2014]. Es wäre wünschenswert einen Prädiktor wie beispielsweise den Mutationsstatus des G-Proteins KRAS [Tsuchida et al., 2016, Waring et al., 2016] bei kolorektalen Karzinomen zu haben.

Bei kolorektalen Karzinomen kann im metastasierten Stadium der Einsatz von Cetuximab oder Panitumumab jeweils in Verbindung mit Chemotherapeutika, wie Fluoropyrimidine (5-Fluoruracil, Capecitabine), Oxaliplatin oder Irinotecan, in Erwägung gezogen werden. Bei schlechter Verträglichkeit anderer Chemotherapeutika ist auch eine Monotherapie mit Cetuximab möglich. Wie bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ist auch bei kolorektalen Karzinomen die EGFR-Expression kein Prädiktor für das Ansprechen auf Cetuximab. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass nur Patienten ohne KRAS-Mutation in Exon 2 von einer Therapie mit Cetuximab profitieren. Auch Patienten mit Mutationen in den KRAS Exonen 3 und 4, sowie Mutationen in den NRAS Exonen 2, 3 und 4 profitieren nicht von Cetuximab, sodass sich letztlich nur ca. 50 % aller metastasierten Patienten mit kolorektalen Karzinomen für eine Therapie mit Cetuximab bzw. Panitumumab qualifizieren [Stintzing, 2014, Waring et al., 2016].

Die nicht qualifizierten restlichen 50 % werden nicht mit Cetuximab oder Panitumumab therapiert und werden somit nicht unnötiger Weise möglichen Nebenwirkungen der Therapie ausgesetzt, sondern bekommen unmittelbar alternative Therapien. Nebenbei trägt diese prätherapeutische Evaluation zudem zu einer effektiveren Nutzung begrenzter finanzieller Ressourcen bei.

Von einem bereits klinisch fest etablierten und verlässlichen Prädiktor, wie KRAS-Mutationen bei kolorektalen Karzinomen, ist man bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches weit entfernt. Ein möglicher Ansatzpunkt bzw. ein möglicher alternativer Erklärungsansatz für mangelndes Ansprechen auf eine Cetuximab-Therapie könnten Veränderungen von EGFR sein. Solche EGFR-Genveränderungen sind bekannt. Die häufigste Mutation der extrazellulären Domäne ist dabei die Epidermal Growth Factor Receptor Variante III (EGFRvIII) [Gan et al., 2013]. Dass EGFRvIII für ein schlechtes Ansprechen auf eine Cetuximab-Therapie verantwortlich sein könnte, implizieren Untersuchungen an Zelllinien [Sok et al., 2006] und Patienten [Tinhofer et al., 2011].

Sok et al. [Sok et al., 2006] konnten an EGFRvIII transfizierten UM-22B Zelllinien eine verringerte Reaktion auf Cetuximab im Vergleich zu nicht transfizierten UM-22B Zelllinien und auch im Vergleich zu Zelllinien, die mit einem entsprechenden Kontrollvektor ohne EGFRvIII transfiziert wurden, beobachten. Eine 72-stündige Inkubation mit Cetuximab überlebten 55 % der nicht transfizierten Zellen und 54 % der mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen nicht, wohingegen bei den EGFRvIII transfizierten Zellen nur 33 % nicht überlebten. Sok et al. beobachteten außerdem in thymusaplastischen Mäusen ein deutlich stärkeres Tumorwachstum von EGFRvIII positiven Tumoren im Vergleich zum Kontrolltumorgewebe.

Tinhofer et al. [Tinhofer et al., 2011] beschrieben 2011, dass Patienten mit hoher EGFRvIII-Expression mit geringer Wahrscheinlichkeit von einer Cetuximab beinhaltenden Therapie profitieren.

2.5.2 Epidermal Growth Factor Receptor Variante III

Die Epidermal Growth Factor Receptor Variante III (bzw. Epidermal Growth Factor Receptor variant III, kurz EGFRvIII; auch bekannt unter de2-7EGFR oder Δ EGFR) ist eine Variante des EGFR.

EGFRvIII entsteht durch die Deletion der Exone 2 bis 7 [Gan et al., 2013] des insgesamt 28 Exone [Reiter and Maihle, 1996] beinhaltenden EGFR-Gens (Abbildung 4, Seite 20). Es handelt sich dabei um eine Deletion von insgesamt 801 Basenpaaren, was zu einem Verlust von 267 Aminosäuren der extrazellulären Domäne führt. Damit hat EGFRvIII mit 145 kDa im Vergleich zu EGFR mit 170 kDa eine reduzierte Molekülmasse und eine veränderte Struktur. An der Fusionsstelle von Exon 1 und Exon 8 (Abbildung 15, Seite 45) befindet sich nun Glycin als neue Aminosäure [Gan et al., 2013].

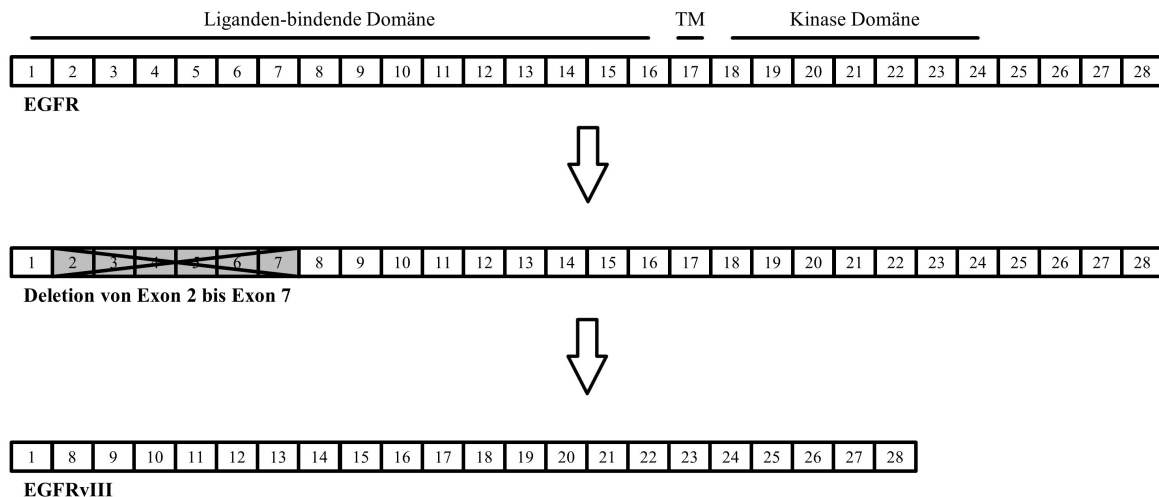


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Entstehungsmechanismus von EGFRvIII durch Deletion von Exon 2 bis Exon 7; TM für Transmembrandomäne; modifiziert nach Reiter und Maihle [Reiter and Maihle, 1996] und Khattri et al. [Khattri et al., 2014].

Bei Glioblastomen geht man davon aus, dass der führende Entstehungsmechanismus von EGFRvIII eine genomische Deletion der Exone 2 bis 7 im Rahmen einer EGFR-Genamplifikation ist. Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches scheint dies nicht so eindeutig. Wheeler et al. konnten zeigen, dass hier EGFRvIII ähnlich häufig auch in Karzinomen ohne EGFR-Genamplifikation vorkommt [Wheeler et al., 2015]. Auch Chau et al. zeigten, dass bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches EGFRvIII nicht nur bei EGFR-Genamplifikation vorkommt, wie dies bei Glioblastomen fast ausschließlich der Fall ist [Chau et al., 2011]. Es muss also andere oder zusätzliche Mechanismen geben. Möglichkeiten wären eine Dysregulation der Transkription oder alternatives Spleißen. Wheeler et al. fanden Hinweise darauf, dass alternatives Spleißen zur Entstehung von EGFRvIII führen könnte. Sie konnten aber keine Mutationen in sogenannten splice acceptor oder splice donor Sequenzen in genomischer DNA oder noch nicht gespleißter RNA finden und gehen davon aus, dass alternatives Spleißen ebenfalls nicht der einzige Mechanismus ist [Wheeler et al., 2015]. Letztendlich sind die genauen Mechanismen nicht abschließend geklärt. Anders als bei Glioblastomen scheinen aber mehrere Mechanismen zur Expression von EGFRvIII beizutragen.

Der Verlust von Teilen der extrazellulären Domäne und die veränderte Struktur führen zu veränderten Eigenschaften von EGFRvIII. So kann an EGFRvIII kein bekannter Ligand mehr binden. Die Aktivierung von EGFRvIII scheint unabhängig von einer Ligandenbindung zu erfolgen [Chu et al., 1997] und es scheint keine dauerhafte Dimerisierung erforderlich zu sein [Chu et al., 1997, Sharafinski et al., 2010]. Es wird davon ausgegangen, dass EGFRvIII transiente Homodimere bildet und konstitutiv aktiv ist. Auch mögliche transiente Interaktionen mit dem EGFR Wildtyp sind beschrieben [Gan et al., 2013, Huang et al., 1997, Luwor et al., 2004]. Es konnte aber an transfizierten Glioblastomzellen gezeigt werden, dass ein Vorhandensein des EGFR Wildtyps nicht erforderlich ist, um nachgeschaltete Signalwege zu aktivieren [Gan et al., 2013, Luwor et al., 2004].

Die konstitutive Aktivität bzw. Phosphorylierung von EGFRvIII ist dabei geringer als beim aktivierten EGFR Wildtyp. Die Intensität der Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen durch EGFRvIII wird auf ca. 10 % der Aktivierung durch EGFR Wildtyp nach Bindung von Liganden geschätzt [Gan et al., 2013, Huang et al., 1997]. Allerdings scheint der Effekt der konstitutiven Aktivierung von EGFRvIII durch eine verminderte Internalisierung durch Endozytose und verminderte Downregulierung verstärkt zu werden [Gan et al., 2013, Huang et al., 1997]. Somit bleibt EGFRvIII aktiv an der Zelloberfläche. Bedingt wird dieses Phänomen durch die geringer ausgeprägte Phosphorylierung, im Speziellen durch die Hypophosphorylierung an dem Tyrosin 1045. Das phosphorylierte Tyrosin 1045 ist im Normalfall die Bindungsstelle für das Adapterprotein c-Casitas B-lineage Lymphoma (c-Cbl), das als Ubiquitinligase wirkt und die Ubiquitinierung und damit die Eliminierung induziert. Durch die Hypophosphorylierung des Tyrosins 1045 wird diese c-Cbl induzierte Ubiquitinierung unterbrochen [Gan et al., 2013, Han et al., 2006].

Wie dem EGFR Wildtyp sind auch EGFRvIII verschiedene Signalwege nachgeschaltet. Im Vordergrund steht bei EGFRvIII jedoch der PI3K/AKT-Signalweg [Choe et al., 2003, Gan et al., 2013, Klingler-Hoffmann et al., 2003, Li et al., 2004, Mizoguchi et al., 2006, Sharafinski et al., 2010]. Durch diesen Signalweg werden zahlreiche nachgeschaltete Signalproteine und Transkriptionsfaktoren aktiviert. Hierzu zählen unter anderem mTOR (mammalian target of rapamycin), FOX (forkhead transcription factor family, FOXO1, FOXO3a und FOXO4), S6 [Choe et al., 2003] und NF- κ B (nuclear factor κ B) über die Aktivierung von mTORC2 (mTOR CREB-regulated transcription co-activator 2) [Tanaka et al., 2011]. Außerdem kommt es zu einer Reduktion von p^{27KIP1} . p^{27KIP1} ist ein Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (engl. cyclin-dependent kinases, CDKs). p^{7KIP1} bindet und inhibiert CDK2-Cyclin E Komplexe und hemmt so den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus. Geringere Mengen von p^{27KIP1} führen somit zu verstärkter Proliferation [Gan et al., 2013, Narita et al., 2002].

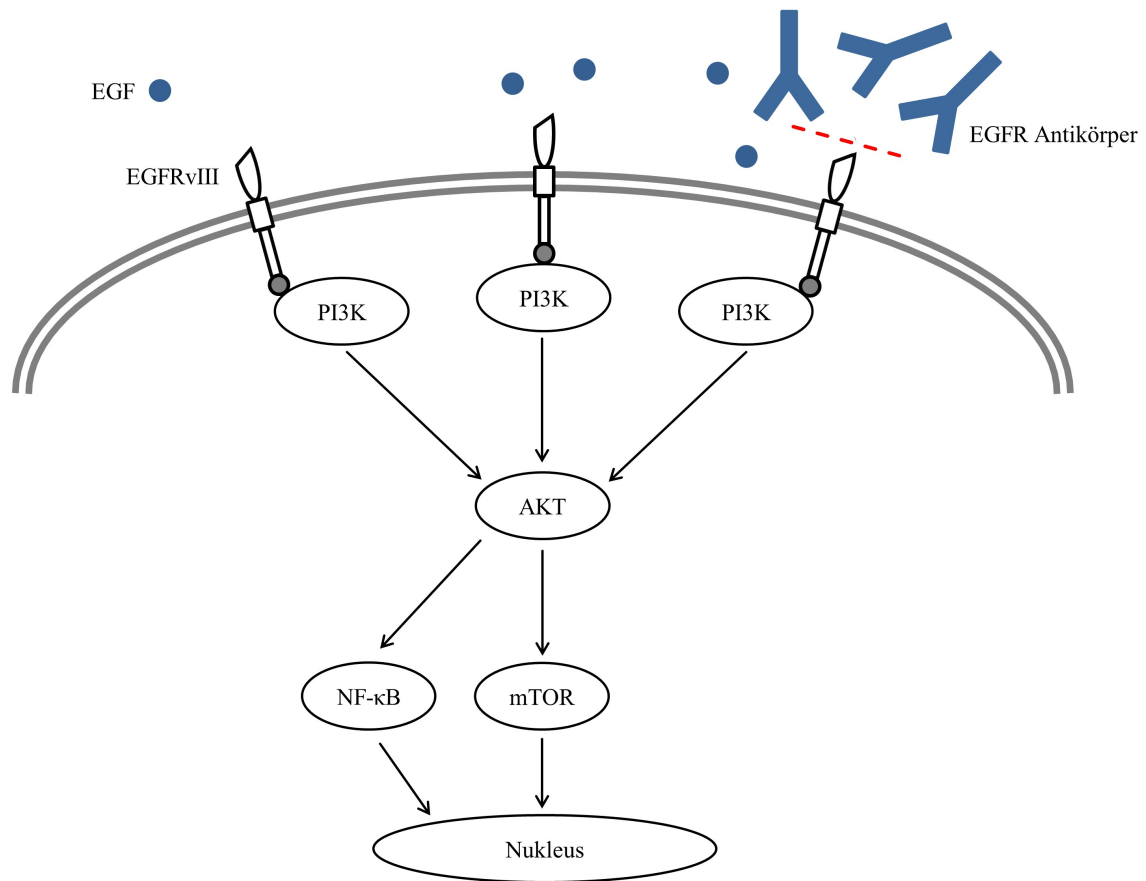


Abbildung 5: EGFRvIII und nachgeschaltete Signalwege; modifiziert nach Martinez-Useros et al. [Martinez-Useros and Garcia-Foncillas, 2015].

Bei EGFRvIII handelt es sich um ein tumorspezifisches Protein [Aldape et al., 2004, Arteaga and Engelman, 2014, Biernat et al., 2004, Ekstrand et al., 1992, Feldkamp et al., 1999, Gan et al., 2013, Garcia de Palazzo et al., 1993, Ge et al., 2002, Jungbluth et al., 2003, Moscatello et al., 1995, Olapade-Olaopa et al., 2000, Saikali et al., 2007, Viana-Pereira et al., 2008, Wikstrand et al., 1995]. Hier ist die Datenlage sehr eindeutig. Zahlreiche publizierte Untersuchungen konnten dies zeigen. Lediglich eine nicht reproduzierbare Studie weist vermeintlich mittels Immunhistochemie EGFRvIII in korrespondierendem Normalgewebe nach [Sonnweber et al., 2006]. Damit scheint EGFRvIII im Hinblick auf zielgerichtete Tumortherapien von großem Interesse. Speziell im Bereich der Glioblastomforschung spielt EGFRvIII eine große Rolle.

2.6 Bedeutung von EGFRvIII in der Behandlung von Glioblastomen

Das Glioblastom ist der häufigste hirneigene Tumor. Er hat die schlechteste Prognose aller Hirntumoren und die Inzidenz scheint steigend [Gan et al., 2013, Monticelli et al., 2018]. Selbst unter der aktuell etablierten Maximaltherapie mittels Bestrahlung und Temozolomid ist im Moment ein medianes Überleben von nur 15 Monaten zu erwarten [Thorne et al., 2016]. Um die Behandlung von Glioblastomen zu verbessern war und ist auch EGFRvIII, bei entsprechend hoher Häufigkeit, Gegenstand intensiver Forschung.

Auch wenn die prognostische Bedeutung von EGFRvIII bei Glioblastomen letztendlich, wie unter Kapitel 6.1.1 ausführlicher beschrieben, eher fraglich scheint, so ist doch eine onkogene Wirkung von EGFRvIII nachweisbar. So zeigen EGFRvIII transfizierte Glioblastom-Zelllinien verstärkte Proliferation, verminderte Apoptose, verstärkte Angiogenese und sie wachsen invasiver. Außerdem haben sie eine ausgeprägte Fähigkeit Xenografts zu bilden. EGFRvIII scheint zudem Chemo- und Strahlenresis-

tenz zu bedingen. Die Chemoresistenz scheint dabei über NF- κ B vermittelt zu werden und EGFRvIII führt über seinen Hauptsignalweg, den PI3K-Signalweg, zu Veränderungen des Zellmetabolismus im Sinne von verstärkter anaerober Glykolyse und verstärkter Lipogenese [Gan et al., 2013].

EGFRvIII scheint bei Glioblastomen gegen klassische anti-EGFR-Therapien, wie monoklonale Antikörper oder Tyrosinkinase-Inhibitoren, relativ resistent zu sein [Gan et al., 2013]. Neben der aktuellen Standardtherapie, die Radiotherapie, Chirurgie und das Zytostatikum Temozolomid beinhaltet [Monticelli et al., 2018], werden alternative Therapieansätze untersucht, bei denen EGFRvIII eine zentrale Rolle spielt. Hierbei sind Rindopepimut (CDX-110) und Depatuximab mafodotin (ABT-414) zu nennen.

Rindopepimut wird als Impfstoff verwendet. Es besteht aus dem Immunmodulator keyhole limpet hemocyanin (KLH) in Verbindung mit einem Peptid aus Cystein und 13 Aminosäuren, die der EGFRvIII-spezifischen Peptidsequenz im Bereich der charakteristischen Deletion entsprechen [Gan et al., 2013, Sampson et al., 2010]. Die Verwendung des Impfstoffes Rindopepimut zeigte allerdings bei neu diagnostizierten Glioblastomen in einer Phase III Studie keinen Vorteil. Lediglich Subgruppen und die Anwendung bei anderen Tumorentitäten werden weiter untersucht [Malkki, 2016, Monticelli et al., 2018].

Depatuximab mafodotin (ABT-414) ist ein Konjugat aus einem Pharmakon und einem Antikörper. Es handelt sich dabei um den Zytoskelett-Inhibitor monomethyl auristatin F (MMAF, auch als Mafodotin bezeichnet) und die humanisierte Variante des Antikörpers mAb806 (Depatuxizumab, auch als ABT-806 bezeichnet) [Reilly et al., 2015, van den Bent et al., 2017]. Dieser anti-EGFR-Antikörper wird durch Beimpfung von Mäusen mit EGFR negativen NR6 Fibroblasten, die mit EGFRvIII transfiziert sind, gewonnen [Jungbluth et al., 2003]. Er bindet EGFR Wildtyp bei Überexpression und onkogenen Mutationen von EGFR, wie beispielsweise EGFRvIII, und weist nur eine limitierte Bindungskapazität an EGFR in normalem Gewebe auf [Gan et al., 2012, van den Bent et al., 2017]. Hierdurch ist er weniger toxisch als andere anti-EGFR-Antikörper. Zudem kann er die Blut-Hirn-Schranke sehr gut passieren. Depatuximab mafodotin, das entsprechende Konjugat aus Pharmakon und Antikörper, wirkt dabei einerseits durch das Konkurrieren mit anderen Liganden und durch das konjugierte Toxin. Zu Depatuximab mafodotin laufen aktuell Arzneimittelstudien [Monticelli et al., 2018, Reardon et al., 2017, van den Bent et al., 2017].

EGFRvIII als tumorspezifischer Rezeptor und möglicher Angriffspunkt für zielgerichtete Therapien könnte möglicherweise auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches von Bedeutung sein. Aktuell ist hierbei allerdings die Relevanz unklar.

3 Darstellung der Problematik und Zielsetzung dieser Arbeit

Widersprüchliche Angaben in der Literatur über das Vorkommen von EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches rechtfertigen bisher keine eindeutige Aussage über die Bedeutung von EGFRvIII bei dieser Tumorentität. Dem Rezeptor wird allerdings generell eine onkogene Wirkung zugesprochen und er könnte potenziell einen Biomarker für das Ansprechen von Therapien mit Substanzen wie beispielsweise und insbesondere dem monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab (Erbix[®], Merck, Darmstadt, Deutschland) darstellen. Lediglich wenige Patienten profitieren von einer Therapie mit Cetuximab [Chau and Hammerman, 2016], was die Dringlichkeit der Suche nach therapieentscheidenden Biomarkern verdeutlicht. Potenziell könnte EGFRvIII Therapieentscheidungen ermöglichen um unnötige bzw. lediglich belastende Therapien und damit verbundene Nebenwirkungen und nicht zu rechtfertigende Kosten zu vermeiden. Auch könnte der tumorspezifische Rezeptor EGFRvIII selbst als Angriffspunkt für zielgerichtete Therapien dienen, wie dies aktuell bei Glioblastomen untersucht wird. Bisher konnte allerdings weder die prognostische Bedeutung, noch ein Effekt auf eine Therapie mit beispielsweise Cetuximab eindeutig geklärt werden.

Das oberste Ziel dieser Arbeit ist dementsprechend, die Bedeutung von EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches genauer zu beleuchten, um letztendlich zur Verbesserung der Therapie dieser Tumorentität beizutragen. Insbesondere die Frage ob bzw. in welcher Häufigkeit EGFRvIII exprimiert wird, soll zunächst mittels verschiedener verlässlicher Methoden nach sorgfältiger Etablierung erfolgen. Eine ergebnisabhängige klinische Korrelation könnte weiteren Aufschluss über die Relevanz von EGFRvIII bringen und zur Klärung der genannten Punkte beitragen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben

4.1.1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Es wurden Gewebeproben von insgesamt 149 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches verwendet. Es handelte sich dabei um Patienten, die alle in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Klinikum rechts der Isar behandelt und im Tumorregister München gelistet wurden.

Die Untersuchung der Patientenproben wurde durch die unabhängige Ethikkommission der Technischen Universität München bewilligt (Projektnummer 1420/05).

Die klinischen Daten (Tabelle 23, Seite 27) sind dem klinikinternen Patienteninformationssystem entnommen. Ergänzend wurden Patientenakten gesichtet. Über die vorhandenen pathologischen Berichte wurden die entsprechenden Proben identifiziert und die vorhandenen Paraffinblöcke (Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe, engl. formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE) dem Archiv des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München entnommen. Nach erneuter Verifizierung des Vorhandenseins von ausreichend Tumorgewebe durch die Beurteilung angefertigter Hämatoxylin-Eosin-Routinefärbungen aller potenziell relevanten Paraffinblöcke eines Falls, wurde jeweils der Paraffinblock mit dem prozentual höchsten Tumoranteil ausgewählt.

Zunächst wurden 113 FFPE-Gewebeproben verwendet (Tabelle 20, Seite 25). Diese waren zum Zeitpunkt der Untersuchung alle zwei Jahre und älter. Im Mittel waren die Proben elf Jahre lang gelagert. Die Lagerungszeiten bewegten sich in einem Bereich von zwei bis 21 Jahren.

Geschlecht	Männlich	95	84,1 %
	Weiblich	18	15,9 %
Lokalisation	Mundhöhle	14	12,4 %
	Oropharynx	28	24,8 %
	Hypopharynx	12	10,6 %
	Larynx	23	20,4 %
	Nasopharynx	0	0,0 %
	Nasen- und Nasennebenhöhlen	36	31,9 %
T-Primärtumor	T1	38	33,6 %
	T2	34	30,1 %
	T3	21	18,6 %
	T4	16	14,2 %
	Unbekannt	4	3,5 %
N-Regionäre Lymphknoten	N0	62	54,9 %
	N1	13	11,5 %
	N2	30	26,5 %
	N3	2	1,8 %
	Unbekannt	6	5,3 %
M-Fernmetastasen	M0	96	85,0 %
	M1	2	1,8 %
	Unbekannt	15	13,3 %
G-Histopathologisches Grading	G1	6	5,3 %
	G2	65	57,5 %
	G3	39	34,5 %
	G4	3	2,7 %
	Unbekannt	0	0,0 %

Tabelle 20: Kollektivcharakterisierung, Kollektiv aus 113 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.

Zur Evaluation des Einflusses des Alters der Paraffinblöcke auf den Nachweis von EGFRvIII wurde FFPE-Gewebe von weiteren 26 Fällen untersucht, welches zum Zeitpunkt der Untersuchung weniger als zwei Jahre alt war (Tabelle 21, Seite 26). Alle 26 Fälle wurden 2014 eingebettet.

Geschlecht	Männlich	22	84,6 %
	Weiblich	4	15,4 %
Lokalisation	Mundhöhle	6	23,1 %
	Oropharynx	20	76,9 %
	Hypopharynx	0	0,0 %
	Larynx	0	0,0 %
	Nasopharynx	0	0,0 %
	Nasen- und Nasennebenhöhlen	0	0,0 %
T-Primärtumor	T1	15	57,7 %
	T2	9	34,6 %
	T3	1	3,8 %
	T4	1	3,8 %
	Unbekannt	0	0,0 %
N-Regionäre Lymphknoten	N0	8	30,8 %
	N1	0	0,0 %
	N2	17	65,4 %
	N3	1	3,8 %
	Unbekannt	0	0,0 %
M-Fernmetastasen	M0	25	96,2 %
	M1	1	3,8 %
	Unbekannt	0	0,0 %
G-Histopathologisches Grading	G1	2	7,7 %
	G2	12	46,2 %
	G3	12	46,2 %
	G4	0	0,0 %
	Unbekannt	0	0,0 %

Tabelle 21: Kollektivcharakterisierung, Kollektiv aus 26 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.

Um einen möglichen Einfluss der Fixierung auf den Nachweis von EGFRvIII darzustellen wurden 2015 insgesamt zehn frische Gewebeproben verwendet (Tabelle 22, Seite 26). Die Proben wurden direkt steril vom Operationssaal in Ringerlösung (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) in das Labor transportiert und dort sofort ohne Fixierung tiefgefroren und innerhalb weniger Tage weiter analysiert. Die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten zur Verwendung des Patientenmaterials wurde zuvor eingeholt und die Proben wurden anonymisiert.

Geschlecht	Männlich	9	90,0 %
	Weiblich	1	10,0 %
Lokalisation	Mundhöhle	0	0,0 %
	Oropharynx	6	60,0 %
	Hypopharynx	1	10,0 %
	Larynx	3	30,0 %
	Nasopharynx	0	0,0 %
	Nasen- und Nasennebenhöhlen	0	0,0 %
T-Primärtumor	T1	2	20,0 %
	T2	3	30,0 %
	T3	5	50,0 %
	T4	0	0,0 %
	Unbekannt	0	0,0 %
N-Regionäre Lymphknoten	N0	4	40,0 %
	N1	2	20,0 %
	N2	3	30,0 %
	N3	1	10,0 %
	Unbekannt	0	0,0 %
M-Fernmetastasen	M0	10	100,0 %
	M1	0	0,0 %
	Unbekannt	0	0,0 %
G-Histopathologisches Grading	G1	0	0,0 %
	G2	5	50,0 %
	G3	4	40,0 %
	G4	0	0,0 %
	Unbekannt	1	10,0 %

Tabelle 22: Kollektivcharakterisierung, Kollektiv aus zehn Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.

Geschlecht	Männlich	126	84,6 %
	Weiblich	23	15,4 %
Lokalisation	Mundhöhle	20	13,4 %
	Oropharynx	54	36,2 %
	Hypopharynx	13	8,7 %
	Larynx	26	17,4 %
	Nasopharynx	0	0 %
	Nasen- und Nasennebenhöhlen	36	24,2 %
T-Primärtumor	T1	55	36,9 %
	T2	46	30,9 %
	T3	27	18,1 %
	T4	17	11,4 %
	Unbekannt	4	2,7 %
N-Regionäre Lymphknoten	N0	74	49,7 %
	N1	15	10,1 %
	N2	50	33,6 %
	N3	4	2,7 %
	Unbekannt	6	4,0 %
M-Fernmetastasen	M0	131	87,9 %
	M1	3	2,0 %
	Unbekannt	15	10,1 %
G-Histopathologisches Grading	G1	8	5,4 %
	G2	82	55,0 %
	G3	55	36,9 %
	G4	3	2,0 %
	Unbekannt	1	0,7 %

Tabelle 23: Kollektivcharakterisierung, Gesamtkollektiv aus 149 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.

4.1.1.2 Glioblastomgewebe

Im Rahmen der Etablierung unserer Methoden wurde des Weiteren ein Kollektiv, bestehend aus FFPE-Material von zehn Glioblastomen, verwendet. Dieses wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Jürgen Schlegel (Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, Technische Universität München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das Kollektiv bestand aus neun Glioblastomen aus dem Jahr 2009 und einem Fall aus dem Jahr 2013. Es handelte sich dabei um Gewebe von Patienten, die alle am Klinikum rechts der Isar behandelt wurden.

4.1.2 Zelllinien

Zur Etablierung bzw. Validierung verschiedener Primer zum Nachweis von EGFRvIII wurden unter anderem auch transfizierte Zelllinien verwendet. Es wurden die Zelllinien Cal27 und UD-SCC-5 (kurz UD5) verwendet. Cal27 wurde über das Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Zelllinie UD-SCC-5 stammt von der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität Düsseldorf.

Die Zellen wurden unter Verwendung des standardisierten Nährmediums Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 10 % fetalem Kälberserum (engl. fetal bovin serum, FBS) (Biochrom, Berlin, Deutschland), 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Penicillin/Streptomycin von Biochrom, Berlin, Deutschland) kultiviert.

Alle Zelllinien wurden mit dem pLEARN-EGFRvIII-Plasmid transfiziert. Dieses wurde freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. Ulrich Keller (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Humboldt-Universität und Freie Universität, Berlin, Deutschland) bereitgestellt.

Die stabile Transfektion konnte in Vorarbeiten gezeigt werden [Koch et al., 2017].

4.1.3 Verwendete Kits

Tabelle 24 listet die verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
Bond™ Polymer Refine Detection System	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
InviTrap® Spin Tissue RNA Mini Kit	Stratec Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit	ZytoMed Systems GmbH, Berlin, Deutschland

Tabelle 24: Verwendete Kits.

4.1.4 Reagenzien

Tabelle 25 listet die verwendeten Reagenzien.

Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
5 x RT Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Bond™ Dewax Solution	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Bond™ Epitope Retrieval Solution	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Bond™ Polymer Refine Detection System (Peroxidase Block Lösung, Post Primary Lösung, Polymer Anti-rabbit Poly-HRP-IgG Lösung, Mixed DAB Refine Lösung, Hämatoxylin)	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Bond™ Primary Antibody Diluent	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Bond™ Wash Solution 10X Concentrate	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
DNA Polymerization Mix dNTP Set (20 mM each A, C, G, T)	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien
DNA-Farbstoff peqGREEN	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
DNA-Leiter peqGOLD 100 bp	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
DNA-Leiter peqGOLD Ultra Low Range II	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Meddium (DMEM)	Gibco Life Technologies by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosinlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (engl. fetal bovin serum, FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Geneticin™ Selective Antibiotic (G418 Sulfate)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Hämalaunlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HCl 2 N	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hexanucleotide Mix 10 x conc.	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Kleber, Roti®-Histokitt II	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ladepuffer 6 x Blue Loading Buffer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Lipofectin™ Transfection Reagent	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Maxima® Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaOH 1 N	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Proteinase K	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ringerlösung	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SYBR® FAST qPCR Master Mix (2 x) (DNA Polymerase, SYBR® Green I, MgCl ₂ , dNTPs und Stabilisatoren)	KAPA Biosystems, Boston, USA
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Borat-EDTA-Puffer 10 x (TBE)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 25: Verwendete Reagenzien.

4.1.5 Geräte

Tabelle 26 listet die verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Heracell™ 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Electrophoresis Power Supply	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Färbeautomat Leica Bond-Max	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Heizblock Techne® Dri-Block® DB-2A	Cole-Parmer, Vernon Hills, USA
Kühlplatte COP 30	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München
Kühlschrank	NordCap GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Laborabzug	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Laborautoklav Systec DX-45	Systec GmbH, Linden, Deutschland

Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop Leica DFC Kamera	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Leica DMI 6000B	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop PreciPoint M8	PreciPoint, Freising, Deutschland
Mikrotom Microm HM 355S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrowelle	ok., Marke der Media-Saturn-Holding, Ingolstadt, Deutschland
Paraffin-Streckbad TFB 35	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Pipettierhelfer Accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Research Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank Herasafe™ KS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spectrophotometer NanoDrop 1000 System	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
System zur Geldokumentation E-Box VX2	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermal Cycler C1000™	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexmischer Minishaker MS2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Waage Sartorius LC 621S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage ScalTec SBC21	ScalTec Instruments, Göttingen, Deutschland
Wasserbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5430R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 26: Verwendete Geräte.

4.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 27 listet die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-Well Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
96-Well PCR Plates und Abdeckfolien selbstklebend	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Deckgläser für Objektträger 24 x 50 mm	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße SafeSeal Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml Röhren	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen 100 x 20 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 27: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

4.1.7 Computerprogramme

Tabelle 28 listet die verwendeten Computerprogramme.

Computerprogramm	Hersteller
Bio-Rad C1000 and CFX Manager Software	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Leica Application Suite	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SnapGene 4.0	GSL Biotech LLC, Chicago, USA
SPSS Statistics 24	IBM Corporation, Armonk, USA
Virtual Microscope V.2015-04-03	PreciPoint, Freising, Deutschland

Tabelle 28: Verwendete Computerprogramme.

4.1.8 EGFRvIII-Antikörper

Ein Antikörper gegen EGFRvIII war zum damaligen Zeitpunkt nicht kommerziell zu erhalten. Nach Anfragen bei Herrn Dr. Ingo K. Mellinghoff (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA) und bei Herrn Dr. Darell D. Bigner (Duke University Medical Center, Durham, USA) wurde uns durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Bigner der EGFRvIII-Antikörper L8A4 zugesagt. Ein entsprechend durch die Rechtsabteilungen beider Universitäten geprüftes „Materials Transfer Agreement“ wurde unterzeichnet und wir erhielten am 23.01.2015 200 µl des L8A4 EGFRvIII-Antikörpers. Weitere 200 µl erhielten wir am 13.04.2015.

4.1.9 PCR-Primer

Tabelle 29 und Tabelle 30 listen die verwendeten PCR-Primer mit entsprechenden Sequenzen, Annealing Temperaturen und Amplifikatgrößen. Die verwendeten Primer sind aus den aufgeführten Publikationen entnommen.

	Primer Sequenz forward	Primer Sequenz reverse	Publikation
EGFRvIII Primer 1	5'-GGCTCTGGAGGAAAAGAAAG-3'	5'-TCCTCCATCTCATAGCTGTCG-3'	Yoshimoto et al. [Yoshimoto et al., 2008]
EGFRvIII Primer 2	5'-TGCTGGCTGCGCTCTGC-3'	5'-CACAGGCTCGGACGCAC-3'	Melchers et al. [Melchers et al., 2014]
EGFRvIII Primer 3	5'-GGAGCAGCGATGCGACCCTC-3'	5'-ACACTGCGGACGCCGTCTT-3'	Boeckx et al. [Boeckx et al., 2014]
EGFRvIII Primer 4	5'-ATGCGACCCTCCGGGACG-3'	5'-ATTCCGTTACACACTTTGCGGC-3'	Sok et al. [Sok et al., 2006]
EGFRvIII Primer 5	5'-GAGCTCTTCGGGGAGCAG-3'	5'-GTGATCTGTCACCACATAATTACCTTCT-3'	Yoshimoto et al. [Yoshimoto et al., 2008]
wtEGFR Primer	5'-TGCTGGCTGCGCTCTGC-3'	5'-GAACATCCTCTGGAGGCTGAGA-3'	Melchers et al. [Melchers et al., 2014]

Tabelle 29: PCR-Primer Sequenzen (unterstrichene Sequenz überlappt die Fusionsstelle von Exon 1 und Exon 8).

	Annealing Temperatur	PCR Amplifikat EGFRvIII	PCR Amplifikat wtEGFR	Publikation
EGFRvIII Primer 1	57,0 °C	90 bp	891 bp	Yoshimoto et al. [Yoshimoto et al., 2008]
EGFRvIII Primer 2	64,5 °C	92 bp	894 bp	Melchers et al. [Melchers et al., 2014]
EGFRvIII Primer 3	64,5 °C	187 bp	987 bp	Boeckx et al. [Boeckx et al., 2014]
EGFRvIII Primer 4	61,4 °C	236 bp	1037 bp	Sok et al. [Sok et al., 2006]
EGFRvIII Primer 5	64,5 °C	131 bp	kein Amplifikat	Yoshimoto et al. [Yoshimoto et al., 2008]
wtEGFR Primer	64,4 °C	kein Amplifikat	125 bp	Melchers et al. [Melchers et al., 2014]

Tabelle 30: PCR-Primer Annealingtemperaturen und Amplifikatlängen.

4.2 Methoden

Nach Identifikation der geeigneten FFPE-Gewebeblöcke, wie oben beschrieben, wurden von diesen neben den Hämatoxylin-Eosin-Routinefärbungen immunhistochemische Färbungen angefertigt und RNA isoliert. Außerdem wurde RNA aus Frischgewebe und aus transfizierten Zellen isoliert. Mit Hilfe der RNA wurde cDNA synthetisiert, welche mittels PCR vervielfältigt wurde. Das Nachweisverfahren wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung fortgeführt.

4.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Routinefärbung

Zur initialen Beurteilung von Tumorgewebe wurde die Hämatoxylin-Eosin-Routinefärbung verwendet.

Dazu wurden mit dem Mikrotom (Microm HM 355S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ca. 2 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Nach dem Aufbringen auf Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden diese zur Fixierung für mindestens 30 Minuten bei 60 °C in den Brutschrank verbracht und anschließend entparaffiniert und rehydratisiert. Die Entparaffinierung erfolgte über vier Xylolbäder für jeweils fünf Minuten, die Rehydratisierung über eine absteigende Alkoholreihe bestehend aus jeweils zwei Bädern Ethanol 100 %, Ethanol 96 % und Ethanol 70 % für jeweils eine Minute und abschließend einem Bad mit destilliertem Wasser für ebenfalls eine Minute. Zur Färbung wurden die Objektträger über sechs Minuten in Hämalaun getränkt. Der anschließenden Spülung bzw. Differenzierung mit nicht destilliertem Wasser schloss sich die Gegenfärbung mit wässriger 1 %iger Eosinlösung für drei Minuten an. Nach erneutem Spülen mit nicht destilliertem Wasser folgten die aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils zwei Bädern Ethanol 96 % und Ethanol 100 % für jeweils eine Minute und erneut vier Bäder Xylol für jeweils eine Minute. Nach Fixierung mittels Kleber und 24 mm x 50 mm Deckplättchen und nach Aushärtung erfolgte im Verlauf die Beurteilung.

Die mikroskopische Beurteilung der Gewebeschnitte erfolgte mit dem Leica Mikroskop DMI 6000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und dem PreciPoint M8 Mikroskop (PreciPoint, Freising, Deutschland).

4.2.2 Immunhistochemie

Der immunhistochemische Nachweis von EGFRvIII erfolgte mithilfe des von Dr. Darell D. Bigner (Duke University Medical Center, Durham, USA) zur Verfügung gestellten EGFRvIII spezifischen L8A4 Antikörpers. Durch die Deletion von Exon 2 bis Exon 7 und die konsekutive Verbindung von Exon 1 und Exon 8 entsteht eine neue Aminosäuresequenz, an deren Struktur dieser Antikörper spezifisch bindet [Wikstrand et al., 1995].

Zur immunhistochemischen Färbung wurden wie zur Hämatoxylin-Eosin-Routinefärbung mit dem Mikrotom ca. 2 µm dicke Gewebeschnitte der vorhandenen FFPE-Blöcke angefertigt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht von der Hämatoxylin-Eosin-Routinefärbung, und auch nicht von den zur RNA-Isolierung verwendeten Schnitten abwichen, um entsprechend bei allen Methoden dasselbe Zellmaterial beurteilen zu können. Nach dem Aufbringen auf Objektträger wurden diese zur Fixierung für mindestens 30 Minuten bei 60 °C in den Brutschrank verbracht und anschließend per Hand bzw. zum Großteil per Maschine gefärbt. Nach entsprechender Etablierung der Handfärbung wurde die Maschinenfärbung etabliert und durchgeführt, um eine größere Anzahl von Fällen in kürzerer Zeit zu färben.

Zur Handfärbung erfolgte die Entparaffinierung über vier Xylobäder für jeweils fünf Minuten. Die Rehydratisierung erfolgte über eine absteigende Alkoholreihe bestehend aus jeweils zwei Bädern Ethanol 100 %, Ethanol 96 % und Ethanol 70 % für jeweils zwei Minuten und abschließend ein Bad mit destilliertem Wasser für ebenfalls zwei Minuten. Zur thermischen Antigendemaskierung wurden die entparaffinierten und rehydratisierten Schnitte in EDTA-Puffer (Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer) für sieben Minuten im Dampfdrucktopf gekocht. Der EDTA-Puffer wurde dazu mit 1,116 g EDTA auf 2,5 l destilliertes Wasser hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 8,0 erfolgte mit 1 N NaOH. Nach Einstellung des pH-Wertes wurden die 2,5 l mit destilliertem Wasser auf 3,0 l aufgefüllt. Anschließend erfolgte ein fünfminütiger Waschvorgang mit TRIS-Puffer. Zur Herstellung des TRIS-Puffers wurden 60,5 g TRIS-Base und 90 g NaCl in 700 ml destilliertem Wasser gelöst, mit 2 N HCl auf pH 7,6 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Vor der Verwendung wurde die Lösung erneut mit destilliertem Wasser auf 1/10 verdünnt.

Das weitere Vorgehen erfolgte mit dem biotinfreien und für Primärantikörper sowohl der Maus als auch des Kaninchens entwickelten ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland). Mit dem Reagent 1 („BlockingSolution“, enthält 3 % H₂O₂) des Kits erfolgte über zehn Minuten der Peroxidase-Block zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase und damit zur Reduzierung der Hintergrundfärbung, gefolgt von einem fünfminütigen Waschvorgang mit TRIS-Puffer. Nach dem Trocknen der Objektträger folgte die Antikörperinkubation. Der verwendete L8A4 Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte mit Antibody Diluent des Kits. Es wurde für mindestens zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit TRIS-Puffer für jeweils fünf Minuten und das Trocknen der Objektträger.

Zur Detektion wurden ein bis drei Tropfen Reagent 2 („PostBlock“, durch Hersteller als Verstärkungsreagenz beschrieben) verwendet und 20 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TRIS-Puffer für jeweils fünf Minuten und Trocknen der Objektträger wurde für 30 Minuten mit Reagent 3 („HRP-Polymer“) inkubiert. Bei Reagent 3 handelt es sich um ein sogenanntes Enzym Polymer, in dem mehrere Sekundärantikörper mit mehreren Molekülen Meerrettich-Peroxidase (engl. horse radish

peroxidase, HRP) kovalent verbunden sind. Anschließend wurde dreimalig für fünf Minuten mit TRIS-Puffer gewaschen und schließlich der Objektträger getrocknet.

Zur Färbung wurden 50 µl DAB (3,3'-Diaminobenzidin) in 1000 µl DAB Substrate Buffer des Kits verdünnt. Mit 100 µl des verdünnten DAB wurde dann fünf bis zehn Minuten inkubiert. Um die Färbereaktion durch enzymatische Umsetzung des DAB durch die Meerrettich-Peroxidase zu beenden wurde anschließend einmalig für fünf Minuten mit TRIS-Puffer gewaschen. Die Gegenfärbung des getrockneten Gewebeschnitts erfolgte mit Hämalaun für vier Minuten. Nach Spülung bzw. Differenzierung mit nicht destilliertem Wasser schloss sich die aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils zwei Bädern Ethanol 70 %, Ethanol 96 % und Ethanol 100 % für jeweils zwei Minuten und erneut vier Bädern Xylol für ebenfalls jeweils zwei Minuten an. Nach Fixierung mittels Kleber und Deckplättchen und nach Aushärtung erfolgte im Verlauf die Beurteilung.

Die immunhistochemischen Färbungen mittels Maschine erfolgten mit dem Leica Bond-Max (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) Färbeautomaten und den entsprechenden vom Hersteller Leica optimierten Verbrauchsmaterialien. Es wurde BondTM Dewax Solution, BondTM Wash Solution 10X Concentrate, BondTM Epitope Retrieval Solution 2, BondTM Primary Antibody Diluent und das BondTM Polymer Refine Detection System verwendet. Das BondTM Polymer Refine Detection System ist zur Detektion von gewebegebundenen IgG-Primärantikörpern sowohl der Maus als auch des Kaninchens geeignet. Es enthält kein Biotin um Hintergrundfärbung durch endogenes Biotin zu vermeiden und basiert auf Sekundärantikörpern, die über Polymere an Meerrettich-Peroxidase gebunden sind. Das System ist für FFPE-Material optimiert.

Im BondTM Polymer Refine Detection System sind mehrere Fertiglösungen enthalten. Die Fertiglösung für den Peroxidase-Block enthält 3 – 4 % Wasserstoffperoxid. Die Post Primary Lösung enthält Kaninchen Antikörper gegen IgG der Maus um murine Primärantikörper zu detektieren. Die Polymer Anti-rabbit Poly-HRP-IgG Lösung enthält über Polymere an Meerrettich-Peroxidase gebundene Antikörper zur Detektion von Kaninchen Antikörpern. Außerdem ist das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) als Mixed DAB Refine Lösung und Hämatoxylin zur Gegenfärbung enthalten.

Entsprechend der Handfärbung wurde das Färbeprotokoll mit EDTA-Puffer basierter hitzeinduzierter Antigendemaskierung durchgeführt. Ein ebenfalls vom Hersteller angebotenes enzymatisches Verfahren brachte weniger gute Färbeergebnisse.

Die analog zur Handfärbung angefertigten Schnitte wurden zur immunhistochemischen Färbung vor dem Einbringen in den Färbeautomaten ebenfalls im Brutschrank für mindestens 30 Minuten bei 60 °C fixiert. Die eingebrachten Gewebeschnitte wurden dann durch den Färbeautomaten bei 72 °C mittels BondTM Dewax Solution entparaffiniert und mittels Alkohol und entsprechend mit destilliertem Wasser verdünntem BondTM Wash Solution 10X Concentrate (Endkonzentration 1 x) rehydratisiert. Zur thermischen Antigendemaskierung wurden die Gewebeschnitte 30 Minuten mit der EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) enthaltenden BondTM Epitope Retrieval Solution 2 bei 100 °C erhitzt. Nach Abkühlung wurde bei 35 °C mit BondTM Wash Solution gespült und der Peroxidase-Block durch Inkubation mit der entsprechenden Fertiglösung für fünf Minuten durchgeführt. Nach erneutem Spülen mit BondTM Wash Solution wurde 30 Minuten mit dem gegen EGFRvIII gerichteten Primärantikörper L8A4 in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Zur Verdünnung wurde BondTM Primary Antibody Diluent verwendet. Nach Spülung mit BondTM Wash Solution erfolgte die achtminütige Inkubation mit der Post Primary Lösung und ein erneutes Spülen mit BondTM Wash Solution, bevor acht Minuten mit Polymer Anti-rabbit Poly-HRP-IgG Lösung inkubiert wurde. Vor der Färbung mit der mixed DAB Refine Lösung erfolgte das Spülen mit BondTM Wash Buffer und destilliertem Wasser. Anschließend wurde vor und nach der zehnminütigen Gegenfärbung mit Hämatoxylin mit destilliertem Wasser ge-

spült. Abschließend erfolgte durch die Färbemaschine eine letzte Spülung mit Bond™ Wash Solution und destilliertem Wasser.

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden aus dem Färbeautomaten entnommen und per Hand analog zur Handfärbung mittels aufsteigender Alkoholreihe, Xylol-Bädern, Kleber und Deckplättchen fixiert und im Verlauf beurteilt.

Insgesamt wurden 113 Plattenepithelkarzinome mit dem beschriebenen Antikörper gegen EGFRvIII gefärbt. Als Positivkontrolle diente ein EGFRvIII positives Glioblastom (Abbildung 7, Seite 40).

Wie bei der Routinefärbung erfolgte die mikroskopische Beurteilung der Gewebeschnitte mit dem Leica Mikroskop DMI 6000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und dem PreciPoint M8 Mikroskop (PreciPoint, Freising, Deutschland).

4.2.3 Zellkultur

Die Zellen wurden unter Verwendung des standardisierten Nährmediums Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 10 % fetalem Kälberserum (engl. fetal bovin serum, FBS) (Biochrom, Berlin, Deutschland), 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Penicillin/Streptomycin von Biochrom, Berlin, Deutschland) bei Umgebungsbedingungen von 37 °C und 5 % CO₂ jeweils bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 90 % kultiviert.

4.2.4 Lipotransfektion von Zelllinien

Zur Lipotransfektion wurden 1×10^5 bis $2,5 \times 10^5$ Zellen auf 6-Well Zellkulturplatten ausplattiert und 24 Stunden kultiviert um eine für die Lipotransfektion optimale Zellkonfluenz von 50 bis 70 % zu erreichen. Für die Lipotransfektion wurden die Zellen mit Opti-MEM (Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gespült und ein Milliliter Opti-MEM pro Well als Vorlage hinzugegeben. Opti-MEM ermöglicht die Kultivierung mit reduzierten Serumkonzentrationen.

Alle Zelllinien wurden mit dem pLEARN-EGFRvIII-Plasmid transfiziert. Dieses wurde freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Keller (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Humboldt-Universität und Freie Universität, Berlin, Deutschland) bereitgestellt.

Es wurden 5 µg der Plasmid-DNA in 100 µl Opti-MEM pipettiert, vorsichtig durchmischt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Parallel wurden 15 µl des Lipofectin™ Reagenz (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in ebenfalls 100 µl Opti-MEM pipettiert, vorsichtig durchmischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden diese beiden Ansätze gemischt und erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden hierzu 800 µl Opti-MEM ergänzt um das endgültige Reaktionsgemisch zu erhalten.

Dieses Reaktionsgemisch wurde dann tropfenweise auf die entsprechend vorbereiteten Zellen pipettiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte der Wechsel des Mediums auf das entsprechende Standardkulturmedium.

Nach 24 Stunden Kultivierung mit Standardmedium erfolgte die Selektion der positiv transfizierten Zellen mittels G418-Selektion. Hierzu wurden 0,8 bis 1,0 mg/ml Geneticin™ Selective Antibiotic (G418 Sulfate) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hinzugefügt und hiermit über fünf bis sieben Tage kultiviert.

Die stabile Transfektion konnte in Vorarbeiten gezeigt werden [Koch et al., 2017].

4.2.5 RNA-Isolierung

RNA wurde von insgesamt 149 Plattenepithelkarzinomen gewonnen. Davon bei insgesamt 139 Fällen aus FFPE-Material und bei zehn Fällen aus Frischgewebe. Hierbei wurde das InviTrap[®] Spin Tissue RNA Mini Kit des Herstellers Stratec Biomedical (Stratec Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland) verwendet. Außerdem wurde RNA aus Zelllinien gewonnen. Dazu wurde das Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Aufgrund der Verwendung von β -Mercaptoethanol wurde unter dem Laborabzug gearbeitet.

4.2.5.1 RNA-Isolierung aus FFPE-Material

Nach sorgfältiger Reinigung von Arbeitsfläche und Pipetten mit einem Ethanol-HCl-Gemisch wurden zur Gewinnung von RNA aus FFPE-Material, in Abhängigkeit von der Größe des Präparats, drei bis sechs 10 μ m dicke Gewebeschnitte in einem Mikroreaktionsgefäß entparaffiniert. Dabei wurde darauf geachtet, die oxidierten oberflächlichen Schichten nicht zu verwenden. Es wurde ebenfalls darauf geachtet, dass die Schnitte nicht von der Hämatoxylin-Eosin-Routinefärbung und den zur Immunhistochemie verwendeten Schnitten abweichen, um entsprechend bei allen Methoden dasselbe Zellmaterial beurteilen zu können. Die Entparaffinierung im Mikroreaktionsgefäß erfolgte dann durch Vermengung mit 800 μ l Xylol mittels Vortexmischer. Nach Zugabe von 400 μ l Ethanol und erneuter Vermengung mittels Vortexmischer erfolgte jeweils das Zentrifugieren mit 13000 rpm für vier Minuten. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet erneut mit 1 ml Ethanol vermengt. Nach erneutem Zentrifugieren mit 13000 rpm für vier Minuten und anschließendem Verwerfen des Überstands wurde das verbliebene und nun entparaffinierte Zellpellet bei 55 °C im Heizblock getrocknet.

Zur weiteren Isolierung von RNA aus FFPE-Material wurden die getrockneten Zellpellets über zwei Nächte mit 200 μ l Proteinase K-Puffer (50 mM TRIS und 1 mM EDTA in sterilem destilliertem Wasser) mit Tween-20 (Polysorbat 20) (ein Teil Tween-20 zu 200 Teilen des Proteinase K Puffers um eine zur Lysierung von Zellen geeignete Konzentration zwischen 0,005 und 0,5 % zu erreichen), 32 μ l 10 % Natriumdodecylsulfat und 80 μ l Proteinase K (20 mg/ml bei mindestens 30 U/mg) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) im Heizblock verdaut. Am zweiten Tag wurden hierbei weitere 10 μ l Proteinase K zum Nachverdau hinzugegeben. Der Heizblock wurde während des gesamten Proteinase K-Verdau auf 55 °C und 450 rpm eingestellt.

Im weiteren Verlauf der RNA-Isolierung wurden Materialien des InviTrap[®] Spin Tissue RNA Mini Kits (Stratec Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland) verwendet.

Am dritten Tag wurden zur Aufreinigung und Entfernung der DNA 600 μ l Lysis Solution TR des Kits mit β -Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1 dem Ansatz hinzugegeben. Das im InviTrap[®] Spin Tissue RNA Mini Kit enthaltene Lysis Solution TR enthält DNA-bindende Trägerpartikel. Nach sorgfältiger Vermengung mit dem Vortexmischer erfolgte das Zentrifugieren mit 13000 rpm für zwei Minuten. 500 μ l des Überstands wurden nun in ein neues Mikroreaktionsgefäß pipettiert, mit 330 μ l Ethanol gemischt und das Lysat komplett auf ein RTA Spin Filter Set mit RNA-bindendem Filter gegeben. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte das Zentrifugieren mit 10500 rpm. Der Durchlauf wurde verworfen. Die im RTA Spin Filter gebundene RNA wurde nun mit 500 μ l Wash Buffer R1 und anschließend dreimal mit 600 μ l Wash Buffer R2 aufgereinigt. Dazu wurde jeweils der entsprechende Wash Buffer auf den Filter gegeben, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 10500 rpm zentrifugiert und jeweils der Durchlauf verworfen.

Zum Trocknen des Spin Filters wurde dieser fünf Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde zur Fällung der RNA der Spin Filter auf ein RNase-freies Mikroreaktionsgefäß des Kits gesetzt. In Abhängigkeit von der ursprünglichen Gewebemenge wurden dann 30 bis 60 μ l Elution Buffer R

direkt auf den Spin Filter pipettiert. Nach zwei Minuten Inkubationszeit mit dem Elution Buffer R bei Raumtemperatur wurde die RNA schließlich durch einminütiges Zentrifugieren mit 10500 rpm aus dem Spin Filter in das RNase-freie Mikroreaktionsgefäß verbracht.

Die RNA wurde direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.5.2 RNA-Isolierung aus Frischgewebe

Das verwendete Frischgewebe wurde direkt, bzw. nach kurzzeitiger Lagerung bei -20 °C, mittels Donce Handhomogenisator in 3 ml Proteinase K-Puffer mit Tween-20 homogenisiert. Das homogenisierte Material wurde auf drei Mikroreaktionsgefäße verteilt und für vier Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Zur weiteren Isolierung von RNA aus Frischgewebe wurden die frischen Zellpellets analog zur RNA-Isolierung aus FFPE-Material über zwei Nächte im Heizblock verdaut. Auch die weitere Isolierung der RNA mit Hilfe des InviTrap® Spin Tissue RNA Mini Kits (Stratec Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland) wurde analog zur RNA-Isolierung aus FFPE-Material durchgeführt.

4.2.5.3 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Zur Isolierung von RNA aus Zellkulturen wurde das Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Bei Erreichen einer Konfluenz der kultivierten Zellen von ca. 80 % wurden die adhären Zellen nach Entfernung des Kulturmediums zweimalig mit 4 ml PBS (phosphate buffered saline, PAA Laboratories by GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien) gespült. Anschließend wurden 500 µl Lysepuffer des RNeasy Mini Kits mit β-Mercaptoethanol in einem Verhältnis von 100:1 auf den Zellrasen einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser gegeben und für zehn Minuten inkubiert. Das Lysat wurde daraufhin in ein Mikroreaktionsgefäß verbracht und 500 µl 70 % Ethanol hinzugegeben. Davon wurden nach ausgiebiger Durchmischung mittels Pipette wiederum 70 µl auf eine RNeasy Mini Spin Column gegeben und für 15 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Nun wurden 700 µl RW1-Puffer des Kits auf die Spin Column gegeben und 15 Sekunden mit 12000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchlaufs erfolgten zwei weitere Spülungen mit 500 µl RPE-Puffer des Kits, der zuvor mit 100 % Ethanol im Verhältnis 1:5 verdünnt wurde. Zur ersten Spülung mit RPE-Puffer wurde auch hier 15 Sekunden mit 12000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Zur zweiten Spülung mit RPE-Puffer wurde eine Minute mit 12000 rpm zentrifugiert und die Spin Column im Anschluss an das Verwerfen des Durchlaufs zur Fällung der RNA auf ein RNase-freies Mikroreaktionsgefäß gesetzt. Es wurden 150 µl Diethyldicarbonat (DEPC) Wasser auf die Spin Column pipettiert und nach Inkubation über eine Minute für ebenfalls eine Minute mit 12000 rpm zentrifugiert.

Die RNA wurde direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.6 RNA-Konzentrationsmessung

Die RNA Konzentrationsmessung erfolgte mit dem NanoDrop 1000 System der Firma PEQLAB (PEQLAB, Erlangen, Deutschland).

Nach sorgfältiger Reinigung der Messflächen des NanoDrop 1000 Systems wurde der Leerwert mit dem Elution Buffer R des InviTrap® Spin Tissue RNA Mini Kits, der bei der RNA-Isolierung als Träger der RNA verwendet wurde, bestimmt. Entsprechend wurde der Leerwert zur Messung der RNA Konzentration nach Isolierung aus Zelllinien mit dem verwendeten Diethyldicarbonat (DEPC) Wasser bestimmt. Anschließend erfolgten die Messung der einzelnen Proben und eine Kontrolle mit destilliertem Wasser.

Zur Quantifizierung der RNA-Mengen wird hierbei ausgenutzt, dass Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm haben. Zudem wird die Absorbance_{260/280}, also das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm, zur Abschätzung der Reinheit herangezogen. So haben beispielsweise Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm und führen folglich bei einer Verunreinigung zur Reduktion der Absorbance_{260/280} [Okamoto and Okabe, 2000].

Die Absorbance_{260/280} ist bei sehr geringen RNA-Konzentrationen nur noch eingeschränkt aussagekräftig. Entsprechend wurden nur RNA Proben mit einer Mindestkonzentration von 5 ng/μl und einer Absorbance_{260/280} zwischen 1,5 und 2,2 verwendet. Alle anderen Proben wurden neu isoliert und erneut gemessen. Waren die Proben erneut nicht verwendbar, wurde der Fall nicht weiter untersucht.

Die RNA wurde direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.7 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA erfolgte mittels Maxima[®] Reverse Transkriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Nach sorgfältiger Reinigung von Arbeitsfläche und Pipetten mit einem Ethanol-HCl-Gemisch wurde eine RNA-Menge von 200 ng in ein Mikroreaktionsgefäß auf Eis pipettiert. Dazu wurden 1 μl Hexanucleotide Mix 10 x conc. (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) als Primer für die Reverse Transkriptase und 1 μl DNA Polymerization Mix dNTP (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien) pipettiert und mit sterilem destilliertem Wasser auf eine Menge von 14,5 μl aufgefüllt. Bei sehr geringen RNA-Konzentrationen wurde dieser RNA-Mix mit einer RNA-Menge von 50 ng erstellt um das Gesamtvolumen von 14,5 μl nicht übersteigen zu müssen. Der RNA-Mix wurde nach Vermengung mittels Vortexmischer kurz zentrifugiert, für fünf Minuten bei 65 °C zur Auflösung der RNA-Sekundärstruktur im Thermomixer inkubiert und danach wieder auf Eis gestellt.

Anschließend wurde ein Enzym-Mix bestehend aus 1 μl Maxima[®] Reverse Transkriptase 200 U/μl (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 4 μl 5 x RT Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 0,5 μl sterilem destilliertem Wasser hinzugegeben und nach kurzem Vermengen mittels Vortexmischer zur Enzymaktivierung für zehn Minuten bei 25 °C inkubiert. Anschließend folgten 30 Minuten Inkubation bei 50 °C Reaktionstemperatur. Die Reaktion wurde durch fünfminütiges Erhitzen bei 85 °C und konsekutiver Enzymdenaturierung beendet.

Das Produkt wurde sofort auf Eis gestellt und anschließend weiterverwendet bzw. bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.8 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) wird zur Vervielfältigung und zum Nachweis von DNA-Sequenzen verwendet. Im Speziellen wurden zum Nachweis von EGFRvIII die Reverse Transkription und PCR (rt-PCR) kombiniert. Hierbei wird entsprechende EGFRvIII-Boten-RNA (engl. messenger RNA, mRNA) nachgewiesen. Dies erfolgt durch Synthetisieren von komplementärer DNA (engl. complementary DNA, cDNA) nach RNA Templates, welche dann mittels PCR vervielfältigt wird.

Durch den Nachweis von mRNA wird die Genexpression gezeigt. Aufgrund des noch nicht geklärten Entstehungsmechanismus von EGFRvIII umgeht man zudem das Problem der fraglichen Nachweisbarkeit oder des fraglichen Vorhandenseins von EGFRvIII auf DNA-Ebene oder auf Ebene der noch nicht gespleißten RNA [Wheeler et al., 2015].

Die auf FFPE Gewebematerial optimierte rt-PCR ist eine verbreitete Methode zum Nachweis von EGFRvIII, da aufgrund von bestehenden Patenten und laufenden Lizenzen Antikörper gegen EGFRvIII zur immunhistochemischen Färbung kaum verfügbar sind [Gan et al., 2013, Yoshimoto et al., 2008] und es außerdem bei einigen dieser Antikörper Zweifel an der Spezifität gibt [Gan et al., 2013]. Des Weiteren steht gefrorenes Gewebematerial nicht routinemäßig zur Verfügung [Yoshimoto et al., 2008].

Zur Vervielfältigung einer DNA- bzw. cDNA-Sequenz mittels PCR sind spezifische Primer nötig. Zur Etablierung der PCR-Primer zum Nachweis von EGFRvIII wurde EGFRvIII positives Glioblastomgewebe verwendet. Von dem mittels L8A4 EGFRvIII-Antikörper immunhistochemisch deutlich anfärbbaren Glioblastom (Abbildung 7, Seite 40) wurde dazu RNA gewonnen und cDNA synthetisiert.

Zur Validierung wurden außerdem ein EGFRvIII-Plasmid und mit diesem Vektor transfizierte und etablierte EGFRvIII-Zelllinien verwendet.

Es wurden insgesamt fünf bereits publizierte EGFRvIII-Primer und ein EGFR-Wildtyp-Primer etabliert (Tabelle 29, Seite 30 und Tabelle 30, Seite 30). Allen EGFRvIII-Primern ist gemeinsam, dass die spezifische Primerhybridisierung (engl. primer annealing) jeweils in cDNA Abschnitten von Exon 1 und Exon 8 der ursprünglichen EGFR-DNA-Sequenz stattfindet. Durch die charakteristische Deletion der Exone 2 bis 7 bei EGFRvIII entstehen relativ kurze PCR-Produkte von hier 90, 92, 187, 236 bzw. 131 Basenpaaren. Das Vorhandensein der kompletten EGFR-cDNA ohne Deletion der Exone 2 bis 7 (EGFR Wildtyp) führt theoretisch außerdem zu längeren PCR-Produkten, wenn sich die Primersequenz nicht über die Bindungsstelle von Exon 1 und 8 der EGFRvIII-cDNA erstreckt. Im Speziellen würden sich PCR-Produkte mit 891, 894, 987 bzw. 1037 Basenpaaren ergeben. Ein PCR-Primer erstreckt sich über die Bindungsstelle der Exone 1 und 8 und würde kein Amplifikat ergeben. Generell ist der Nachweis solch großer Amplifikate allerdings bei FFPE-Material schwierig.

Der EGFR Wildtyp wurde mit einem PCR-Primer mit Hybridisierungsstellen in Exon 1 und 2 nachgewiesen. Hierbei ergibt sich bei Vorhandensein von EGFR Wildtyp ein Amplifikat von 125 Basenpaaren. EGFRvIII fehlen die Exone 2 bis 7, wodurch kein Amplifikat möglich ist.

Zur Etablierung der PCR-Primer wurden zunächst jeweils Gradienten-PCRs mit einem Temperaturgradienten verschiedener Annealing-Temperaturen durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA von EGFRvIII positivem Glioblastomgewebe verwendet. Mit Hilfe der unten beschriebenen Agarose-Gelelektrophorese wurde die optimale Annealing-Temperatur ermittelt (Tabelle 30, Seite 30) um unspezifische Bindungen bei zu niedrigen Temperaturen bzw. ausbleibende Primerhybridisierung bei zu hohen Temperaturen zu vermeiden.

Die Validierung erfolgte mittels etablierter transfizierter EGFRvIII-Zelllinien und einem EGFRvIII-Plasmid.

Die PCR wurde mit einem Bio-Rad C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) durchgeführt.

Der PCR Mix enthielt jeweils 12,5 µl KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2 x) (KAPA Biosystems, Boston, USA) (Endkonzentration 1 x), 0,5 µl forward Primer (Endkonzentration 0,8 pmol), 0,5 µl reverse Primer (Endkonzentration 0,8 pmol), 9,5 µl steriles destilliertes Wasser und 2 µl cDNA Template. Der KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2 x) Universal enthielt dabei DNA-Polymerase (antibody-mediated hot start), SYBR® Green I, MgCl₂, dNTPs und Stabilisatoren.

Der Bio-Rad C1000™ Thermal Cycler wurde auf 95 °C für 15 Minuten programmiert. Nach diesen 15 Minuten folgten 45 Zyklen bestehend aus 95 °C für 30 Sekunden, der Annealing-Temperatur des jeweiligen Primers (Tabelle 30, Seite 30) und 72 °C für 30 Sekunden.

4.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Trärgels wurden 2 g Agarose mit 120 ml TBE-Puffer (1 x) (aus 10 x TRIS-Borat-EDTA-Puffer des Herstellers life technologies AG by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgegossen und ca. fünf Minuten in der Mikrowelle aufgeköcht um bei einem Zielvolumen von 100 ml ein 2 %iges TBE Agarose-Gel zu erhalten. Nach mäßiger Abkühlung auf dem Magnetrührer wurden in das noch flüssige Agarose-Gel 8 µl des DNA-Farbstoffs peqGREEN (PeqLab, Erlangen, Deutschland) zugegeben und weiter gerührt. Nach ausreichender Vermischung wurde das Gel in entsprechend vorgesehene Formen gegossen und nach Aushärtung in die horizontale Elektrophoreseeinheit eingebracht und mit TBE Puffer (1 x) bedeckt.

Die Geltaschen wurden anschließend mit den Proben und Markern beladen. Dazu wurden zuvor jeweils 10 µl der Proben bzw. PCR-Produkte mit 1,8 µl 6 x Blue Loading Buffer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gemischt. Für die Marker wurden 1,5 µl der Marker (peqGOLD 100 bp DNA-Leiter und peqGOLD Ultra Low Range DNA-Leiter II des Herstellers PEQLAB, Erlangen, Deutschland) mit 8 µl destilliertem Wasser verdünnt und ebenfalls mit 1,8 µl 6 x Blue Loading Buffer gemischt. Bei den zwei verwendeten Markern handelt es sich um Marker, die jeweils aus zehn Fragmenten bestehen. Der peqGOLD 100 bp DNA-Leiter enthält Fragmente mit 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 Basenpaaren, der peqGOLD Ultra Low Range DNA-Leiter II Fragmente mit 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50 und 25 Basenpaaren (Abbildung 6, Seite 38).

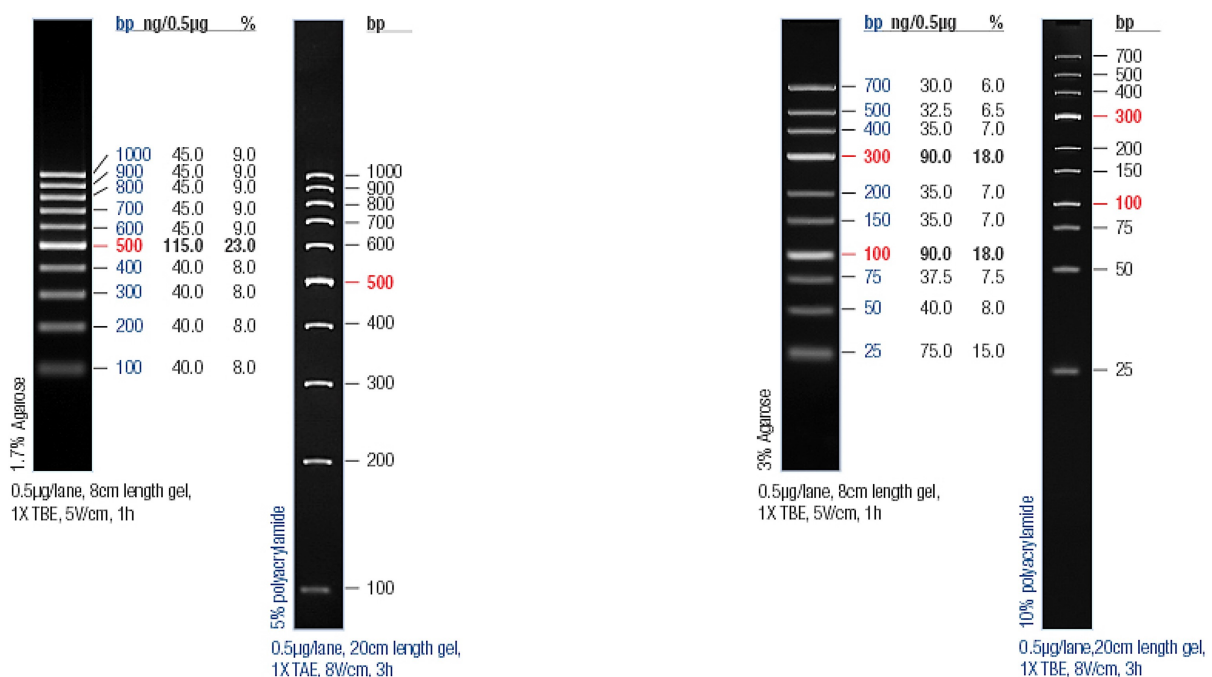


Abbildung 6: Herstellerdarstellung der DNA-Leitern peqGOLD 100 bp (links) und peqGOLD Ultra Low Range II (rechts); aus Datenblättern der DNA-Leitern des Herstellers PEQLAB, Erlangen, Deutschland.

Die Geltaschen wurden jeweils mit 9 µl beladen. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit einer Standardeinstellung von 90 V über 2,5 Stunden durchgeführt.

Insgesamt wurden 149 Plattenepithelkarzinome mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

4.2.10 Sequenzierung

Nach der Auswertung der Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese wurden alle potenziell EGFRvIII positiven Fälle sequenziert. Dazu wurden die jeweiligen PCR Produkte und die entsprechenden Primer an die Firma MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) gesandt. Die Sequenzierung erfolgte dort mit einem ABI 3730XL Sequenzierungsgerät mittels Didesoxymethode nach Sanger.

Zur Auswertung wurde die spezifische Sequenz, die sich aus der Fusion von Exon 1 und Exon 8 ergibt, aufgesucht. Exon 1 endet mit der Basensequenz 5'-GGGCTCTGGAGGAAAAGAAAG-3' und Exon 8 beginnt mit 5'-GTAATTATGTGGTGACAGATC-3' [Khattri et al., 2014]. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 15 auf Seite 45.

4.2.11 Statistik

Die durchgeführten statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm SPSS Statistics 24 der Firma IBM (Tabelle 28, Seite 29). Als Signifikanzlevel wurde ein Wert von 5 % für alle statistischen Tests festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Hinweis auf eigene Publikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind größtenteils in der 2017 erschienen Publikation unserer Forschungsgruppe abgedruckt:

Epidermal growth factor receptor variant III in head and neck squamous cell carcinoma is not relevant for targeted therapy and irradiation [Koch et al., 2017]

5.2 Immunhistochemie

Bei Glioblastomen wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass unter Verwendung mehrerer Nachweisverfahren EGFRvIII in 25 bis 64 % [Gan et al., 2013] nachgewiesen werden kann. Somit ist die Wahrscheinlichkeit bei zehn Fällen ein EGFRvIII positives Gewebe zu identifizieren entsprechend hoch. Durch eine immunhistochemische Färbung, wie unter Kapitel 4.2.2 beschrieben, konnte ein EGFRvIII positives Glioblastom identifiziert werden (Abbildung 7, Seite 40), welches zur weiteren Etablierung unserer Methoden als Positivkontrolle verwendet wurde. Es handelte sich dabei um einen Fall aus dem Jahr 2009. Die identifizierte Negativkontrolle war ebenfalls aus dem Jahr 2009.

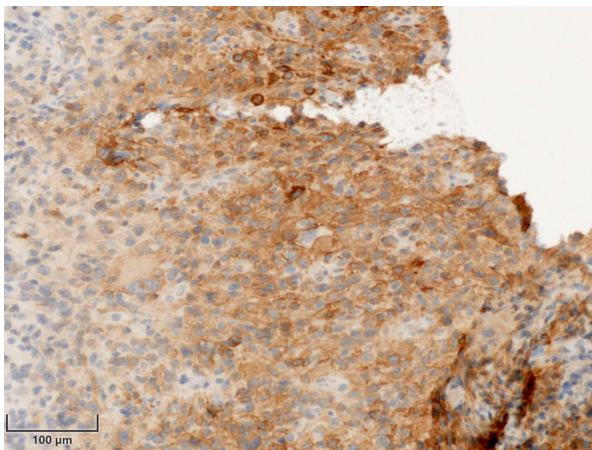


Abbildung 7: Glioblastomgewebe (Präparat 6G), EGFRvIII positiv; erstellt mit PreciPoint M8 Mikroskop.

Insgesamt wurden nach Etablierung des L8A4-Antikörpers 113 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches jeweils mit Positiv- und Negativkontrolle gefärbt. Hierbei konnte stets die Positivkontrolle eindeutig angefärbt werden. Die Negativkontrolle war stets negativ.

Es konnte lediglich ein positiver Fall identifiziert werden (Abbildung 8 links, Seite 41). Bei diesem zeigte sich eine eindeutige Membranfärbung. Es handelte sich dabei um ein niedrig differenziertes Plattenepithelkarzinom des rechten Nasenflügels, das 1998 in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde am Klinikum rechts der Isar reseziert wurde.

Ebenfalls in Abbildung 8 ist rechts beispielhaft eine EGFRvIII negative Färbung eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches aus dem beschriebenen Kollektiv dargestellt.

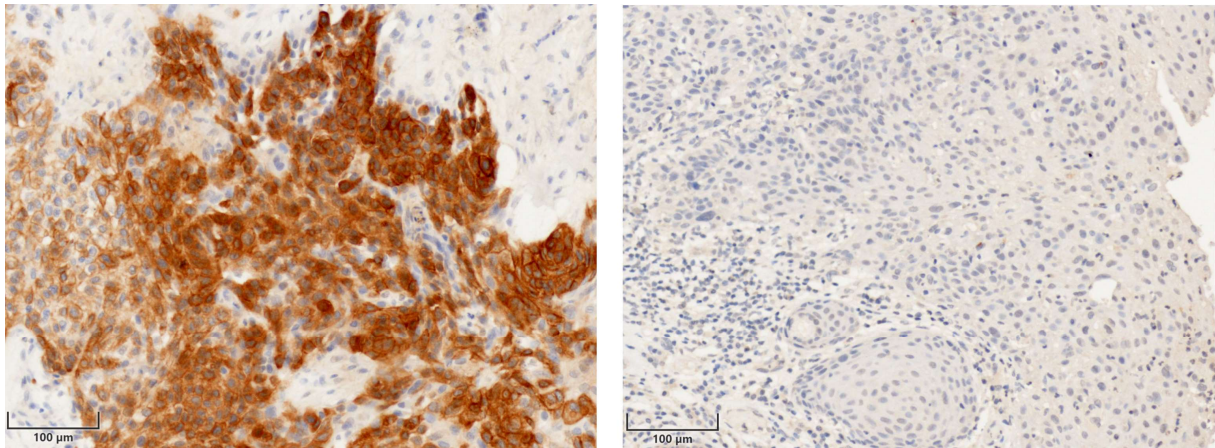


Abbildung 8: EGFRvIII positives Plattenepithelkarzinom Fall 4J (links); EGFRvIII negatives Plattenepithelkarzinom Fall 42 (rechts); erstellt mit PreciPoint M8 Mikroskop.

5.3 Polymerase Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese

Das identische Kollektiv aus 113 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches wurde parallel nach RNA-Isolierung, RNA-Konzentrationsmessung und cDNA-Synthese mittels rt-PCR, wie unter Kapitel 4.2.8 beschrieben, untersucht.

Zunächst wurde ein von Yoshimoto et al. [Yoshimoto et al., 2008] publizierter Primer (Primer 1, Tabelle 29, Seite 30) etabliert. Mittels Gradienten-PCR mit Annealingtemperaturen von 55,0 bis 65,0 °C, Schmelzkurvenanalyse und Agarose-Gelelektrophorese wurde unter Verwendung des detektierten EGFRvIII positiven Glioblastoms die optimale Annealingtemperatur von 57,0 °C ermittelt (Abbildung 9, Seite 41). Wie in Abbildung 10 zu erkennen, zeigten sich unter Verwendung des EGFRvIII positiven Glioblastoms 6G und des negativen Glioblastoms 7G hierbei eindeutige Schmelzkurven. In der anschließenden Gelelektrophorese, die ebenfalls in Abbildung 10 dargestellt ist, ließ sich das Ergebnis der Schmelzkurvenanalyse betätigen.

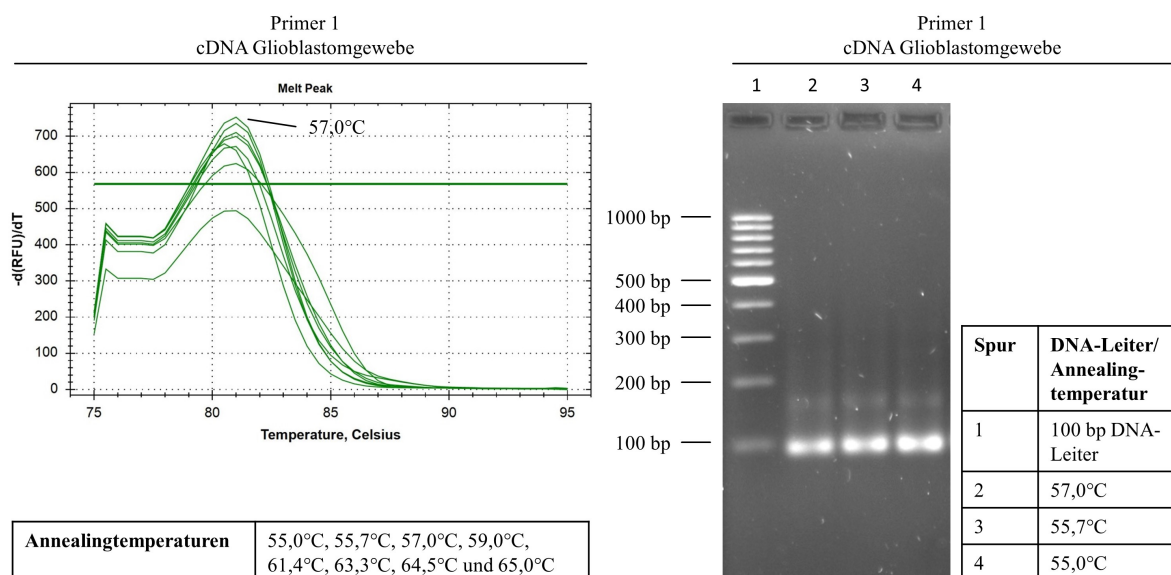


Abbildung 9: Schmelzkurven (links) nach Amplifizierung von cDNA eines EGFRvIII positiven Glioblastoms mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen unter Verwendung des Primers 1 und Agarose-Gelelektrophorese (rechts) im Rahmen der Etablierung des Primers.

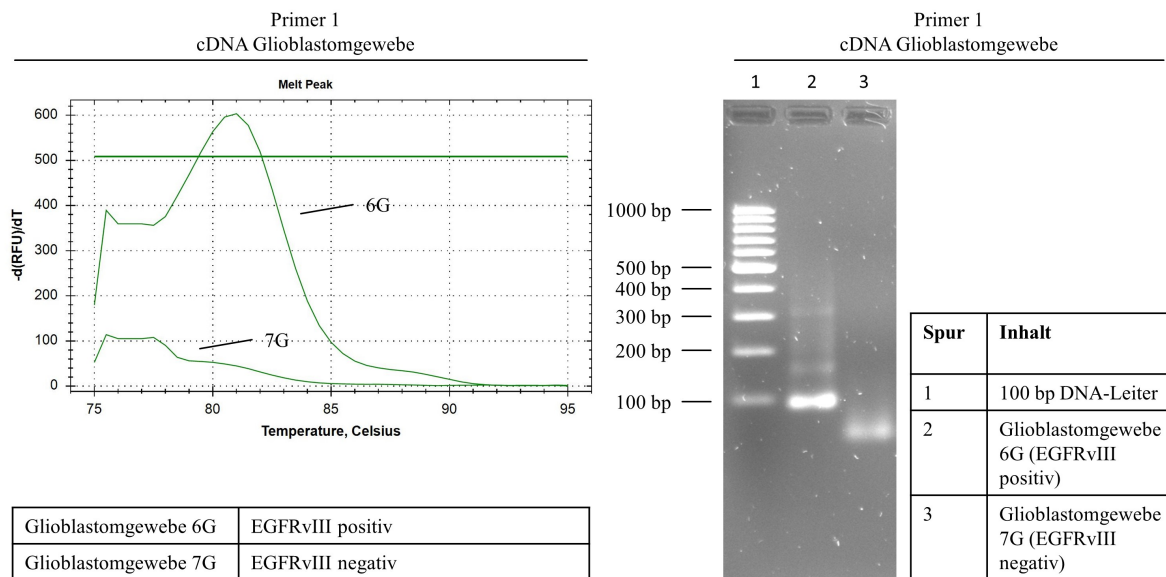


Abbildung 10: Schmelzkurven (links) nach Amplifizierung von cDNA eines EGFRvIII positiven und eines EGFRvIII negativen Glioblastoms unter Verwendung des Primers 1 und Agarose-Gelelektrophorese (rechts).

Bei der Anwendung der Methode auf das Kollektiv von 113 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches zeigte sich, dass die Schmelzkurven nicht eindeutig bzw. nicht verlässlich waren. Im Gegensatz zu den eindeutigen Schmelzkurven des Glioblastomgewebes konnte bei den getesteten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches teilweise keine eindeutige Abgrenzung zwischen EGFRvIII positiv und negativ erfolgen. Folglich konnte auf die Agarose-Gelelektrophorese nicht verzichtet werden.

Aufgrund der uneinheitlichen Angaben über die Häufigkeit von EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches in der Literatur wurden außerdem in selber Weise weitere vier bereits publizierte PCR-Primer etabliert, um ein möglichst hohes Maß an Vergleichbarkeit zu erreichen und um mögliche Ursachen für die uneinheitlichen Angaben zu untersuchen. Auch bei diesen Primern zeigten sich bei Anwendung auf die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches keine verlässlichen Schmelzkurven und es wurden zum Erreichen von möglichst verlässlichen Ergebnissen schließlich ebenfalls nur die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese gewertet. Letztendlich standen fünf etablierte Primer zur Detektion von EGFRvIII zur Verfügung (Tabelle 29, Seite 30). In Abbildung 11 ist die Anwendung dieser fünf Primer auf das EGFRvIII positive Glioblastom und auf ein EGFRvIII-Plasmid dargestellt. Es ist jeweils eine spezifische Bande erkennbar. Primer 1 ergibt sowohl bei dem EGFRvIII positiven Glioblastom als auch bei dem EGFRvIII-Plasmid in der Agarose-Gelelektrophorese eine Fragmentlänge von 90 Basenpaaren, Primer 2 ergibt 92 Basenpaare, Primer 3 187 Basenpaare, Primer 4 236 Basenpaare und Primer 5 131 Basenpaare (Tabelle 30, Seite 30).

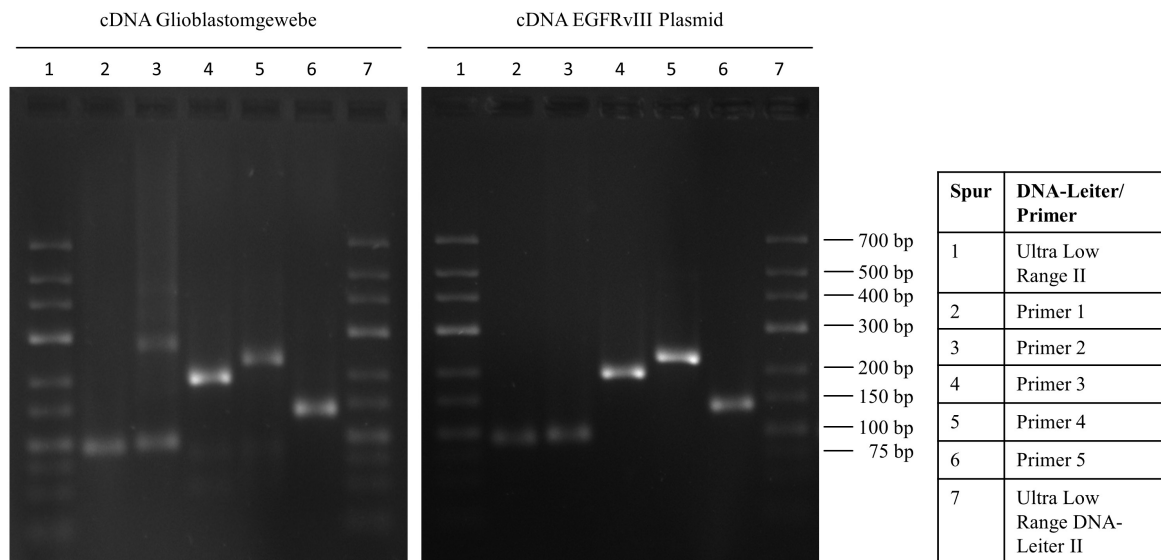


Abbildung 11: Agarose-Gelelektrophorese von mittels fünf verschiedener Primer amplifizierter cDNA eines EGFRvIII positiven Glioblastoms (links) und eines EGFRvIII Plasmids (rechts).

Auch EGFRvIII transfizierte Zelllinien wurden zur Testung verwendet. In Abbildung 12 sind drei Primer dargestellt. Alle drei Primer ergeben eine spezifische Bande bei Verwendung von amplifizierter cDNA der transfizierten Zelllinie Cal27 vIII (jeweils Spalte 5) und weisen somit EGFRvIII nach. Auch bei der transfizierten Zelllinie UD-SCC-5 vIII (kurz UD5 vIII, jeweils Spalte 2) ist der Nachweis von EGFRvIII möglich. Hier zeigt sich allerdings nur eine schwache spezifische Bande bei Anwendung von Primer 5. Die entsprechenden nicht transfizierten Zelllinien zeigen erwartungsgemäß keine spezifischen Banden.

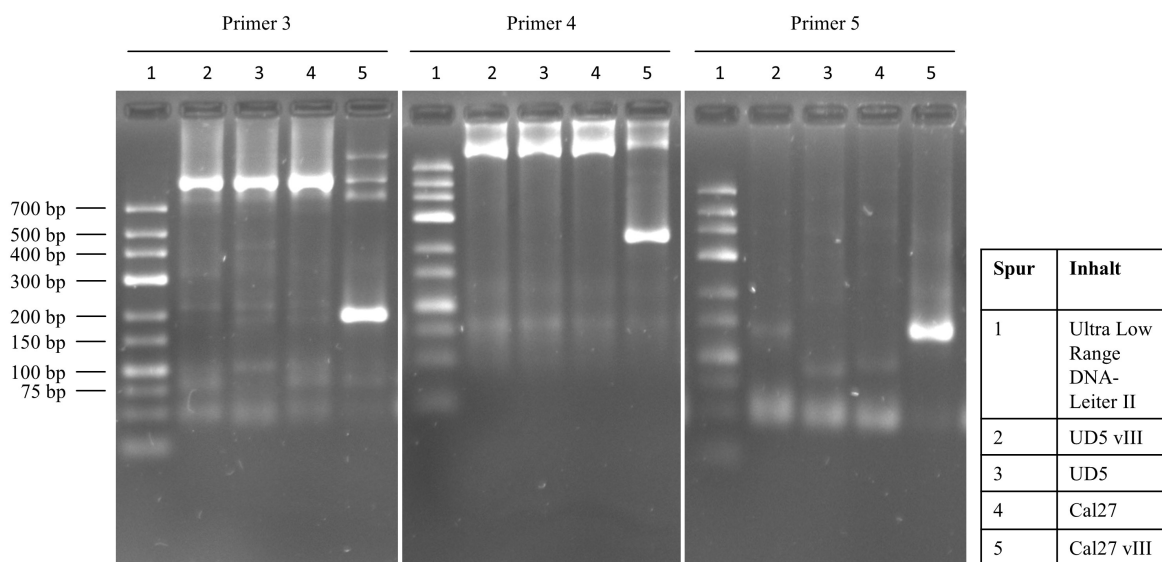


Abbildung 12: Agarose-Gelelektrophorese von mittels unterschiedlicher Primer amplifizierter cDNA von vier verschiedenen Zelllinien (UD5 vIII, UD5, Cal27 und Cal27 vIII).

Mit den sorgfältig etablierten Methoden lässt sich EGFRvIII folglich sowohl in Glioblastomgewebe als auch in transfizierten Zelllinien verlässlich nachweisen. Dies zeigte sich im Verlauf auch bei der Anwendung der Methoden auf das Kollektiv von 113 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Unter Anwendung der optimierten PCR-Bedingungen wurde der immunhistochemisch als EGFRvIII positiv nachweisbare Fall 4J durch alle fünf verwendeten Primer detektiert (Abbildung 13,

Seite 44). Übereinstimmend mit den nachweisbaren spezifischen Fragmenten des EGFRvIII positiven Glioblastomgewebes zeigten sich auch hier mit allen fünf Primern diese spezifischen Fragmente.

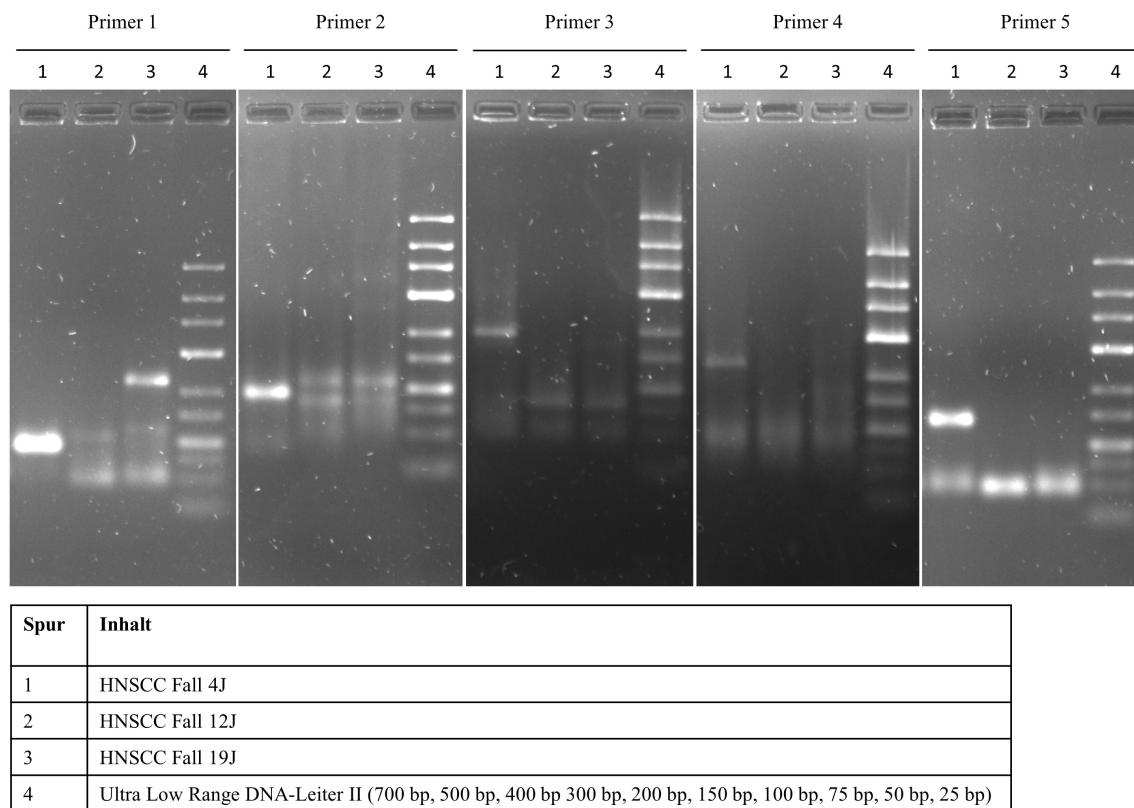


Abbildung 13: Agarose-Gelelektrophorese von mittels fünf verschiedener Primer amplifizierter cDNA des Falls 4J und zwei weiterer Fälle.

Auch wenn der Fall 4J der einzige Fall aller zunächst 113 untersuchten Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches war, der durch alle fünf verwendeten Primer detektiert wurde, so waren doch auch bei anderen Fällen einzelne spezifische Fragmente nachweisbar. Hierbei zeigte sich allerdings, dass die einzelnen Primer sehr unterschiedliche Ergebnisse und zudem teilweise fraglich spezifische Fragmente lieferten. Zur sicheren Beurteilung der Ergebnisse wurden daher alle positiven Fälle sequenziert.

Außerdem wurden zur Überprüfung eines möglichen Einflusses des Alters der Paraffinblöcke weitere 26 Fälle, die alle im Jahr 2014 in Paraffin eingebettet wurden, untersucht. Zur Überprüfung des Einflusses der Fixierung wurden darüber hinaus weitere zehn frische Gewebeproben ohne vorherige Fixierung mit Formalin untersucht.

Parallel konnte bei allen getesteten Gewebearten und Zelllinien der EGFR Wildtyp ausnahmslos und eindeutig mittels rt-PCR nachgewiesen werden. Hierzu wurde ein PCR-Primer etabliert, dessen Hybridisierungsstellen sich in Exon 1 und Exon 2 befinden und bei vorhandener EGFR-Wildtyp-RNA bzw. daraus synthetisierter cDNA ein Amplifikat von 125 Basenpaaren liefert. Durch die vorhandene Deletion von Exon 2 bis Exon 7 bei EGFRvIII, führt EGFRvIII-RNA bzw. -cDNA zu keinem Amplifikat. Abbildung 14 zeigt beispielhaft die entsprechenden spezifischen Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese des EGFRvIII positiven (6G) und des negativen (7G) Glioblastoms, der EGFRvIII positiven (Cal27 vIII) und der negativen (Cal27) Zelllinie und von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (übrige Fälle).

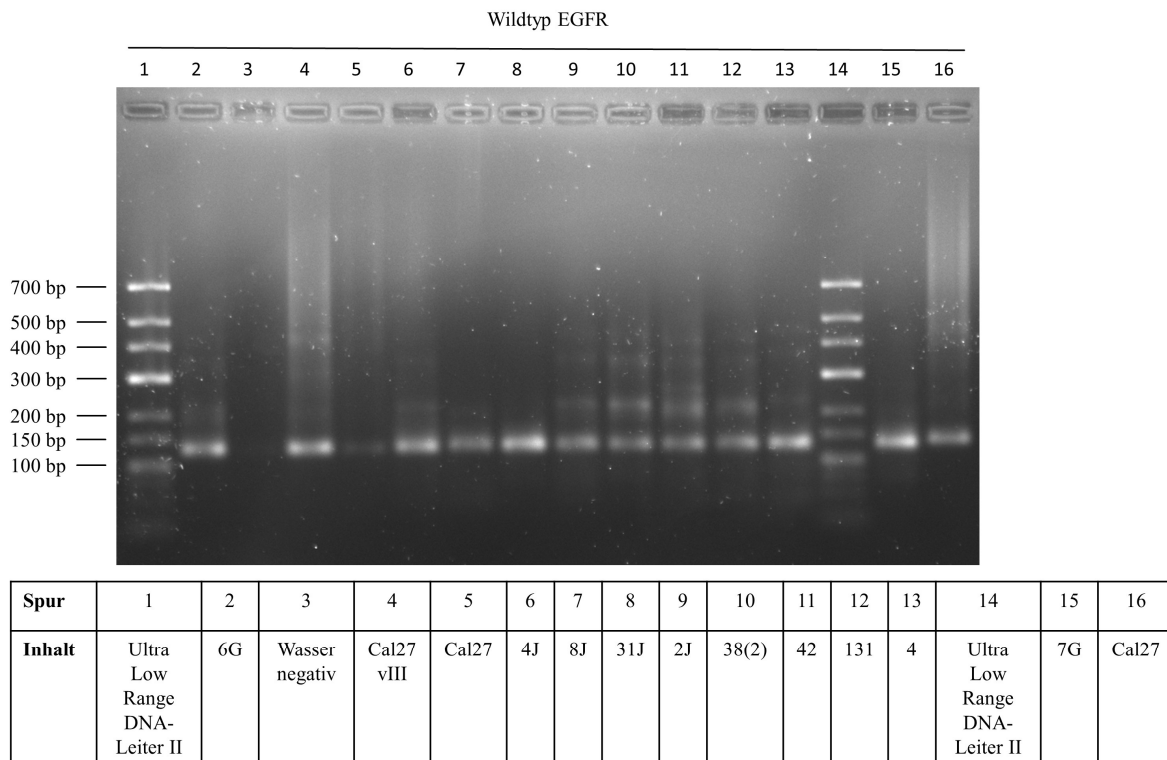


Abbildung 14: Agarose-Gelelektrophorese von mittels wtEGFR-Primer amplifizierter cDNA.

5.4 Sequenzierung

Zur abschließenden Beurteilung der Ergebnisse von rt-PCR und Agarose-Gelelektrophorese erfolgte bei allen potenziell EGFRvIII positiven Fällen der Agarose-Gelelektrophorese eine Sequenzierung. Hierbei wurde, wie unter Kapitel 4.2.10 beschrieben, die spezifische Sequenz, die sich aus der Fusion von Exon 1 und Exon 8 ergibt, aufgesucht.

Abbildung 15 zeigt eine schematische Darstellung der Basensequenzen der spezifischen Fusionsstelle.

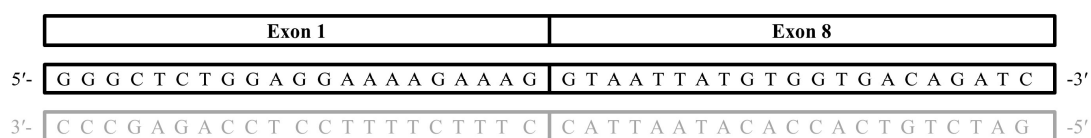


Abbildung 15: Schematische Darstellung der spezifischen EGFRvIII-Fusionssequenz; DNA-Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T); modifiziert nach Khattri et al. [Khattri et al., 2014].

In Abbildung 16 ist beispielhaft das Sequenzierungsergebnis, des als Positivkontrolle verwendeten Glioblastoms 6G, dargestellt. Hierbei wurde der Primer 5 verwendet. Es zeigte sich die exakte Fusionssequenz von Exon 1 und Exon 8.

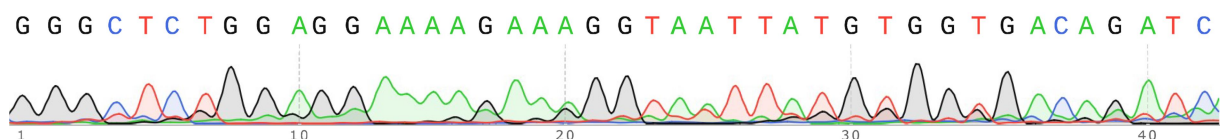


Abbildung 16: Sequenzierungsergebnis Glioblastomgewebe 6G; Fusionssequenz der Exone 1 und 8 (Primer 5 forward).

Auch bei dem bereits immunhistochemisch und mittels aller fünf Primer detektierbaren Fall 4J zeigte sich bei der Sequenzierung mit dem forward Primer 5 die exakte Fusionssequenz. Das Sequenzierungsergebnis dieses Plattenepithelkarzinoms ist in Abbildung 17 dargestellt.

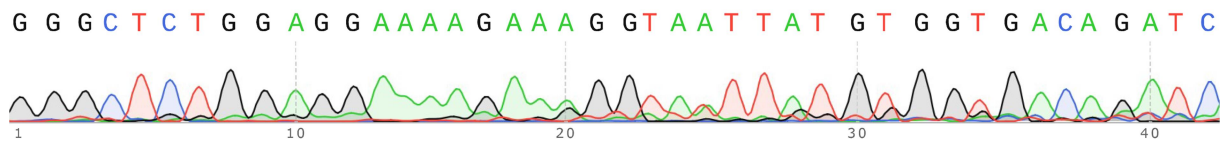


Abbildung 17: Sequenzierungsergebnis Plattenepithelkarzinom 4J; Fusionssequenz der Exone 1 und 8 (Primer 5 forward).

Es musste festgestellt werden, dass die Primer unterschiedlich gut für die Sequenzierung geeignet waren. Primer 1 konnte lediglich bei drei von 13 Sequenzierungen ausgewertet werden. In den restlichen Fällen gelang weder mit dem forward noch mit dem reverse Primer 1 ein auswertbares Sequenzierungsergebnis. Primer 2 konnte zwar lediglich in einer von elf Sequenzierungen nicht ausgewertet werden, zeigte aber bei allen Sequenzierungen, bis auf die Positivkontrolle, ein negatives Ergebnis. Die Fusionssequenz konnte auch bei dem immunhistochemisch nachweisbaren und mittels aller fünf Primer detektierbaren Fall 4J nicht identifiziert werden, obwohl bei diesem Fall bei der Sequenzierung mit Primer 3, Primer 4 und Primer 5 diese Fusionssequenz nachgewiesen werden konnte. Für die weiteren Untersuchungen an weniger lange gelagertem FFPE Material und an Frischgewebe wurden daher Primer 1 und Primer 2 nicht mehr verwendet.

Wie in Tabelle 31 dargestellt, konnten mittels Sequenzierung neben der Positivkontrolle insgesamt fünf der 113 untersuchten Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches als EGFRvIII positiv identifiziert werden. Die Tabelle stellt zur besseren Übersicht lediglich die Fälle der 113 Plattenepithelkarzinome dar, deren Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese eine Sequenzierung rechtfertigte.

	Primer 1			Primer 2			Primer 3			Primer 4			Primer 5		
	Age.	Sequenzierung		Age.	Sequenzierung		Age.	Sequenzierung		Age.	Sequenzierung		Age.	Sequenzierung	
		for.	rev.		for.	rev.		for.	rev.		for.	rev.			
6G	pos.	n.a.	n.a.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
5				pos.	neg.	neg.									
8	pos.	n.a.	n.a.												
12				pos.	neg.	neg.									
4J	pos.	n.a.	n.a.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	n.a.
5J													pos.	n.a.	n.a.
7J	pos.	neg.	neg.	pos.	n.a.	neg.									
11J				pos.	neg.	neg.									
13AJ							pos.	neg.	neg.						
14J				pos.	neg.	neg.									
15J				pos.	neg.	neg.									
18J				pos.	neg.	neg.									
21J				pos.	n.a.	n.a.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.			
24J	pos.	n.a.	n.a.				pos.	neg.	neg.						
26J				pos.	neg.	neg.									
27J	pos.	neg.	neg.												
29J													pos.	n.a.	n.a.
31J	pos.	n.a.	n.a.							pos.	pos.	pos.			
33J	pos.	n.a.	n.a.												
37J	pos.	n.a.	n.a.												
35	pos.	n.a.	n.a.												
42							pos.	pos.	pos.						
38(2)							pos.	pos.	pos.						
104	pos.	n.a.	neg.												
131										pos.	pos.	neg.			
139							pos.	n.a.	neg.						
116(2)							pos.	neg.	neg.						
158	pos.	n.a.	n.a.												
164	pos.	n.a.	n.a.												

Tabelle 31: Ergebnisse von rt-PCR, Agarose-Gelelektrophorese (Age.) und Sequenzierung des Kollektivs aus 113 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches; es sind lediglich Fälle dargestellt, bei denen ein positives Ergebnis bei mindestens einer Methode zu beobachten war.

Die Untersuchung des jüngeren Kollektivs aus 26 Fällen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches aus dem Jahr 2014 ergab positive Sequenzierungsergebnisse bei fünf von 26 Fällen. Tabelle 32 stellt die Ergebnisse aller 26 Fälle dar.

	Primer 3			Primer 4			Primer 5		
	Age.	Sequenzierung		Age.	Sequenzierung		Age.	Sequenzierung	
		for.	rev.		for.	rev.		for.	rev.
6G	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
D1.14	pos.	pos.	pos.						
D2.14									
D3.14	pos.	n.a.	neg.						
D4.14	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.			
D5.14	pos.	neg.	neg.						
D6.14									
D7.14									
D8.14									
D9.14									
D10.14									
D11.14	pos.	pos.	pos.						
D12.14									
D13.14									
D14.14	pos.	pos.	pos.				pos.	pos.	neg.
D15.14				pos.	neg.	pos.			
D16.14									
D17.14									
D18.14									
D19.14	pos.	neg.	neg.						
D20.14									
D21.14									
D22.14									
D23.14	pos.	neg.	neg.						
D24.14	pos.	pos.	pos.						
D25.14									
D26.14							pos.	neg.	neg.

Tabelle 32: Ergebnisse von rt-PCR, Agarose-Gelelektrophorese (Age.) und Sequenzierung des Kollektivs aus 26 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.

Die Ergebnisse des untersuchten Frischgewebes sind in Tabelle 33 dargestellt. Es ergaben sich drei positive Fälle.

	Primer 3			Primer 4			Primer 5		
	Age.	Sequenzierung		Age.	Sequenzierung		Age.	Sequenzierung	
		for.	rev.		for.	rev.		for.	rev.
F1	pos.	neg.	neg.						
F2	pos.	neg.	neg.				pos.	pos.	neg.
F3	pos.	neg.	neg.						
F4				pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	n.a.
F5	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.			
F6	pos.	neg.	neg.						
F7				pos.	neg.	neg.			
F8	pos.	neg.	neg.						
F9	pos.	neg.	neg.						
F10									

Tabelle 33: Ergebnisse von rt-PCR, Agarose-Gelelektrophorese (Age.) und Sequenzierung des Kollektivs aus Frischgewebe von zehn Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.

Insgesamt wurden somit bei 149 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches 13 Fälle nach Sequenzierung als EGFRvIII positiv gewertet, was einem Anteil von ca. 8,7 % entspricht. Zu betonen ist, dass nur ein Fall durch alle fünf Primer detektiert wurde. Dieser Fall ist auch das einzige immunhistochemisch nachgewiesene Plattenepithelkarzinom.

5.5 Einfluss von Alter und Fixierungsmethode des Gewebes auf den Nachweis von EGFRvIII

Mögliche Einflussfaktoren auf den Nachweis von EGFRvIII könnten das Alter und die Fixierungsmethode des Gewebes sein. Hierdurch könnten auch uneinheitliche Angaben über die Häufigkeit von EGFRvIII in der Literatur erklärbar sein. Dem ersten Kollektiv, bestehend aus FFPE Gewebe von 113 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, das zum Zeitpunkt der Untersuchung zwei bis 21 Jahre gelagert war, wurden daher wie beschrieben zwei weitere Kollektive ergänzt.

Mittels Sequenzierung wurden unter den 113 Plattenepithelkarzinomen fünf Fälle und somit ca. 4,4 % als EGFRvIII positiv detektiert. Unter den weiter untersuchten, weniger lange gelagerten 26 FFPE Gewebeproben aus dem Jahr 2014, konnten ebenfalls fünf Fälle und somit ca. 19,2 % detektiert werden. Das untersuchte Frischgewebe ergab drei positive Fälle und somit 30 % bei zehn Gewebeproben. EGFRvIII scheint somit bei weniger lange gelagerten Gewebeproben und bei Frischgewebe häufiger nachweisbar zu sein. Bei dem mittels aller fünf Primer, Sequenzierung und Immunhistochemie detektierten Fall 4J, handelte es sich um 17 Jahre gelagertes FFPE Gewebematerial. Abbildung 18 veranschaulicht die relativen Häufigkeiten in den drei Kollektiven.

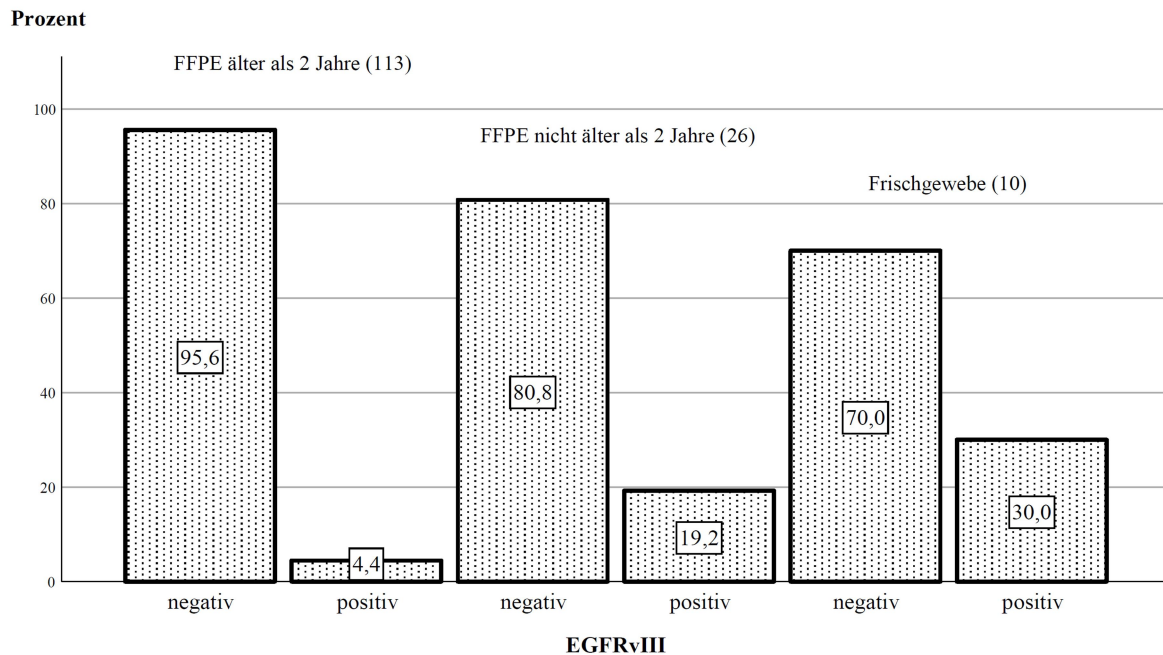


Abbildung 18: Darstellung der relativen Häufigkeiten des EGFRvIII-Nachweises mittels Sequenzierung in den drei beschriebenen Kollektiven; entsprechende Prozentangaben sind in den einzelnen Balken angegeben; erstellt mit SPSS Statistics.

Abbildung 19 zeigt erneut die Häufigkeitsverteilung in den drei Kollektiven und stellt zudem die erwarteten Häufigkeiten dar.

Gruppe		EGFRvIII		Gesamt
		negative	positive	
113	Anzahl	108	5	113
	Erwartete Anzahl	103,1	9,9	113,0
26	Anzahl	21	5	26
	Erwartete Anzahl	23,7	2,3	26,0
10	Anzahl	7	3	10
	Erwartete Anzahl	9,1	,9	10,0
Gesamt	Anzahl	136	13	149
	Erwartete Anzahl	136,0	13,0	149,0

Abbildung 19: Kreuztabelle mit absoluten Häufigkeiten des EGFRvIII-Nachweises mittels Sequenzierung in den drei beschriebenen Kollektiven und Angabe der erwarteten Häufigkeiten; erstellt mit SPSS Statistics.

Die geringen Fallzahlen der zwei Vergleichsgruppen mit 26 und zehn Fällen bedingen geringe erwartete Häufigkeiten. Diese geringeren erwarteten Häufigkeiten ermöglichen keinen Chi-Quadrat-Test, da die Approximationsbedingungen des Chi-Quadrat-Tests vorschreiben, dass maximal 20 % aller erwarteten Häufigkeiten kleiner als fünf sein dürfen [Kuckartz et al., 2010].

5.6 Ereigniszeitanalyse und prognostische Relevanz von EGFRvIII

Die Ereigniszeitanalyse mittels Kaplan-Meier-Schätzer ergab für das Gesamtkollektiv mit 149 Fällen ein Fünf-Jahres-Überleben von 60,1 % (Standardfehler: 0,049). Das mediane Überleben betrug 7,194 Jahre mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 5,145 bis 9,244 Jahren. Insgesamt wurden während des Beobachtungszeitraums 58 Todesfälle als Ereignisse registriert. Abbildung 20 zeigt die entsprechend mittels Kaplan-Meier-Schätzer geschätzte Überlebensfunktion.

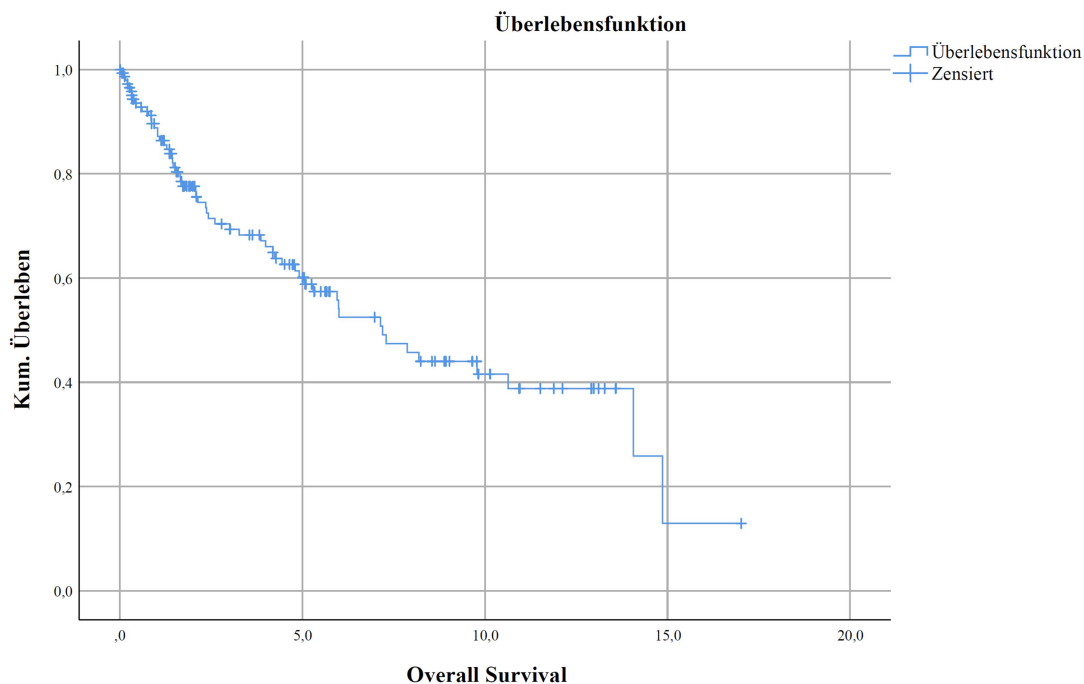


Abbildung 20: Überlebensfunktion des Gesamtkollektivs basierend auf den Kaplan-Meier-Schätzer; erstellt mit SPSS Statistics.

Zur Abschätzung eines möglichen prognostischen Einflusses von EGFRvIII wurde das Gesamtüberleben aller 13 Fälle, die durch Sequenzierung als EGFRvIII positiv bewertet wurden, mit dem Gesamtüberleben der übrigen Fälle verglichen (Abbildung 21, Seite 51).

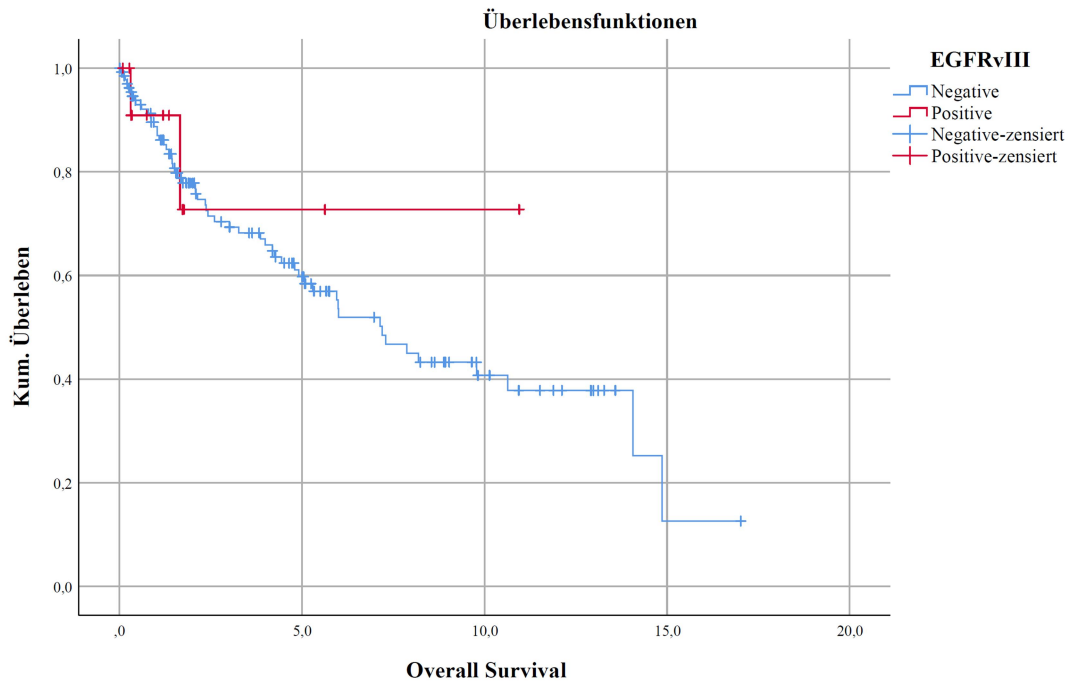


Abbildung 21: Überlebensfunktion der mittels Sequenzierung als EGFRvIII positiv gewerteten Fälle (rot) im Vergleich zum übrigen Gesamtkollektiv (blau); Überlebensfunktion basierend auf den Kaplan-Meier-Schätzer; erstellt mit SPSS Statistics.

Der statistische Vergleich der Überlebensraten erfolgte unter Anwendung des Log Rank Tests. Die diesem Test zugrunde liegende Nullhypothese, dass die Verteilung der Überlebenszeiten in beiden Gruppen gleich ist, konnte bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,618$ (Abbildung 22, Seite 51) nicht abgelehnt werden. Man kann daher nicht von einem Einfluss von EGFRvIII auf das Gesamtüberleben ausgehen.

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,249	1	,618

Abbildung 22: Log Rank Test auf Gleichheit der Überlebensfunktionen der mittels Sequenzierung als EGFRvIII positiv gewerteten Fälle im Vergleich zum übrigen Gesamtkollektiv; erstellt mit SPSS Statistics.

6 Diskussion

Wie einleitend beschrieben, sind Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches keine seltene Tumorentität. Sie gehen zudem mit einer schlechten Prognose einher. Seit vielen Jahren werden trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten kaum veränderte Überlebensraten von ca. 50 % berichtet [Bose et al., 2013]. Neben der chirurgischen Sanierung, Strahlen- und klassischen Chemotherapie, sind zielgerichtete Therapien neue vielversprechende Therapieansätze. Der monoklonale EGFR-Antikörper Cetuximab (Handelsname Erbitux[®], Merck, Darmstadt, Deutschland) spielt dabei aktuell die größte Rolle. Problematisch sind beim Einsatz von Cetuximab allerdings Resistenzmechanismen der Tumorzellen, wodurch Patienten nicht von der zielgerichteten Therapie gegen EGFR profitieren. Es gibt darüber hinaus bisher keine Biomarker, die dahingehend prognostische Aussagekraft haben [Markovic and Chung, 2012]. Untersuchungen an Zelllinien [Sok et al., 2006] und Patienten [Tinhofer et al., 2011] legen nahe, dass EGFRvIII, die häufigste Variante des EGFR, für ein reduziertes Ansprechen auf eine Therapie mit Cetuximab verantwortlich sein könnte.

Problematisch ist allerdings, dass es in der Literatur sehr uneinheitliche Angaben über die Häufigkeit von EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches gibt. Es existieren Angaben, die zwischen 0 % und 80 % schwanken (Tabelle 34, Seite 54). Auch ist die generelle prognostische Relevanz von EGFRvIII unklar.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bedeutung von EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches genauer zu beleuchten, um letztendlich zur Verbesserung der Therapie dieser Tumorentität beizutragen. Insbesondere der Frage nach der Häufigkeit der Expression von EGFRvIII wurde mittels rt-PCR, Agarose-Gelelektrophorese, Sequenzierung und Immunhistochemie nachgegangen und die Ergebnisse wurden entsprechend klinisch korreliert.

6.1 Einordnung in die Literatur

6.1.1 EGFRvIII bei verschiedenen Tumorentitäten

EGFRvIII wurde erstmals 1990 bei Glioblastomen beschrieben [Zhang et al., 2010] und ist an dieser Tumorentität am intensivsten untersucht. Die mit 34 bis 63 % [Felsberg et al., 2017, Gan et al., 2013] häufigste genetische Veränderung bei Glioblastomen ist die EGFR-Genamplifikation, die eine Überexpression von EGFR bedingt. Bei 63 bis 75 % [Gan et al., 2013] dieser Fälle mit EGFR-Genamplifikation können Veränderungen im EGFR-Gen und damit eine Expression von Wildtyp und mutiertem EGFR nachgewiesen werden. Die häufigste Mutation von EGFR ist dabei EGFRvIII, welche wiederum bei Glioblastomen fast ausschließlich bei EGFR-Genamplifikation exprimiert ist [Wheeler et al., 2015]. EGFRvIII kann unter Verwendung mehrerer Nachweisverfahren bei Glioblastomen in 25 bis 64 % [Gan et al., 2013] nachgewiesen werden. Einige Studien belegen, dass Patienten mit EGFRvIII positivem Glioblastom eine schlechtere Prognose haben [Feldkamp et al., 1999, Gan et al., 2013, Shinojima et al., 2003]. Andere Studien können dies wiederum nicht belegen [Aldape et al., 2004, Gan et al., 2013, Viana-Pereira et al., 2008, Weller et al., 2014], sodass die prognostische Bedeutung von EGFRvIII letztendlich eher unklar scheint. Eine 2015 erschienene Metaanalyse von Chen et al. über die prognostische Relevanz der EGFR-Genamplifikation und von EGFRvIII kommt zu der Erkenntnis, dass eine solche Relevanz sowohl der EGFR-Genamplifikation als auch von EGFRvIII bisher nicht nachgewiesen werden kann [Chen et al., 2015].

Bei extrakraniellen Tumorentitäten ist die Datenlage bzgl. des Vorkommens von EGFRvIII und dessen Bedeutung deutlich dünner und teilweise kontrovers diskutiert. Jungblut et al. gehen beispielsweise davon aus, dass EGFRvIII nur bei Glioblastomen existiert [Jungbluth et al., 2003]. Andere Untersuchungen weisen allerdings durchaus EGFRvIII bei einigen bestimmten Tumorarten nach.

Bei kolorektalen Karzinomen scheint EGFRvIII nicht vorzukommen. In drei [Azuma et al., 2006, Jungbluth et al., 2003, Spindler et al., 2006] von vier [Azuma et al., 2006, Cunningham et al., 2005, Jungbluth et al., 2003, Spindler et al., 2006] Studien ist weder EGFRvIII mRNA noch Protein nachweisbar [Gan et al., 2013].

EGFRvIII scheint ebenso bei Karzinomen des Ovars keine Bedeutung zu haben. Angaben über ein Vorkommen von EGFRvIII in 75 % der Fälle [Gan et al., 2013, Moscatello et al., 1995], die auf Western Blot Analysen basieren, scheinen überholt. Zahlreiche Forschungsgruppen konnten zeigen, dass bei Karzinomen des Ovars weder EGFRvIII-mRNA noch -Protein nachweisbar sind [de Graeff et al., 2008, Gan et al., 2013, Jungbluth et al., 2003, Lassus et al., 2006, Rae et al., 2004, Steffensen et al., 2008].

Bei Mammakarzinomen hingegen scheint EGFRvIII nachweisbar, wobei allerdings die Häufigkeit umstritten ist. Es gibt Untersuchungen, die 20 bis 78 % belegen [Gan et al., 2013, Ge et al., 2002, Moscatello et al., 1995, Wikstrand et al., 1995, Yu et al., 2008]. Andere Untersuchungen hingegen bewegen sich in einem Bereich von 0 bis 4 % [Gan et al., 2013, Jungbluth et al., 2003, Nieto et al., 2007, Rae et al., 2004, Tidow et al., 2003]. Bei Mammakarzinomen scheint außerdem das Vorkommen von EGFRvIII mit dem Fortschreiten der Tumorerkrankung zu korrelieren und man vermutet, dass EGFRvIII bei der Tumormetastasierung von Bedeutung ist [Gan et al., 2013].

Bei Bronchialkarzinomen ist das Vorkommen von EGFRvIII abhängig von der histologischen Tumorentität. Bei den nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (engl. non small cell lung cancer, NSCLC) wurde ursprünglich die EGFRvIII-Expression zwischen 16 und 39 % angegeben [Gan et al., 2013]. Diese Angaben basieren jedoch auf Untersuchungen mit relativ unspezifischen Antikörpern, sodass man mittlerweile von deutlich geringeren Prozentzahlen ausgeht, welche zudem vom histologischen Subtyp der NSCLCs abhängig sind. Bei Adenokarzinomen, einem Subtyp der NSCLCs, ist EGFRvIII nicht nachweisbar [Gan et al., 2013, Ji et al., 2006, Ohtsuka et al., 2007, Ohtsuka et al., 2006]. Hingegen kommt bei den nicht-Adenokarzinomen unter den NSCLCs EGFRvIII in 0 bis 8 % der Fälle vor [Gan et al., 2013, Ji et al., 2006, Ohtsuka et al., 2007, Sasaki et al., 2007]. Unter nicht-Adenokarzinomen der NSCLCs fallen Plattenepithelkarzinome, großzellige Karzinome und weitere Karzinomtypen.

Auch bei Prostatakarzinomen wird über EGFRvIII berichtet. Hier scheint die Expression mit der Aggressivität des Tumors zu korrelieren [Olapade-Olaopa et al., 2000].

6.1.2 EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches

Im Gegensatz zu den reproduzierbaren und relativ einheitlichen Daten zum EGFRvIII-Vorkommen bei Glioblastomen, schwanken die Angaben bei Kopf-Hals-Tumoren, wie bei den meisten untersuchten extrakraniellen Tumorentitäten, enorm. Einige Forschungsgruppen gehen davon aus, dass EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches nicht existent ist bzw. können EGFRvIII an ihren Kollektiven nicht nachweisen [Hama et al., 2009, Jungbluth et al., 2003, Melchers et al., 2014]. Es gibt andererseits auch Angaben bis zu 80 % [Tinhofer et al., 2011]. Tabelle 34 zeigt eine Zusammenschau einiger Publikationen und deren Angaben über die Häufigkeit von EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Es sind zudem das Herkunftsland und die verwendeten Nachweismethoden genannt, da hier ein Einfluss vermutet werden kann. Bezüglich einer geographischen Häufung lässt sich mit den vorhandenen Daten kein Muster erkennen.

EGFRvIII	Herkunftsland	Nachweismethode	Primer	Kommentar	Publikation
0 % (0 von 531)	Niederlande (Groningen)	Rt-PCR und Immunhistochemie (L8A4 Anti-	5'-TGCTGGCTGCGCTCTGC-3' 5'-CACAGGCTCGGACGCAC-3' ≙ Primer 2 (92 bp)	FFPE	Melchers et al. [Melchers

		körper)			et al., 2014]
0 % (0 von 82)	Japan (Tokio)	Rt-PCR zur Mutationsanalyse der gesamten EGFR-Sequenz	Primer, die über drei Fragmente die gesamte EGFR-Sequenz abdecken	Gefrorenes Frischgewebe	Hama et al. [Hama et al., 2009]
0 % (0 von 10)	USA (New York), Schweden (Stockholm)	Immunhistochemie (DH8.3)	Kein PCR Verfahren	Gefrorenes Frischgewebe	Jungbluth et al. [Jungbluth et al., 2003]
0 % (0 von 44)	Belgien (Edegem)	Rt-PCR	Nicht publiziert	FFPE	Boeckx et al. [Boeckx et al., 2014]
0,31 % (2 von 638)	USA (Chicago)	Rt-PCR, Immunhistochemie (L8A4 Antikörper) und RNA Sequenzanalyse	5'-GCTCTGGAGGAAAAGAAAAG-GTAATTAT-3' 5'-ACGCCGTCTTCTCCATCT-3' (98 bp) 5'-GAGCTCTTCGGGGAGCAG-3' 5'-GTGATCTGTCACCACATAATTACCTTTCT-3' ≙ Primer 5 (131 bp)	0 von 108: rt-PCR (52 gefrorenes Frischgewebe, 56 FFPE) 0 von 105: Immunhistochemie (FFPE) 0 von 7: RNA Sequenzanalyse (gefrorenes Frischgewebe) 2 von 425: RNA Sequenzanalyse (The Cancer Genome Atlas)	Khattri et al. [Khattri et al., 2014]
2 % (1 von 50)	Kanada (Calgary)	Rt-PCR	5'-TCTGCCCGGCGAGTC-3' 5'-GCCGTGATCTGTCACCACATAATT-3'	Kollektiv enthält nur Mundhöhlenkarzinome (FFPE)	McIntyre et al. [McIntyre et al., 2012]
15,4 % (6 von 39)	China (Zhejiang)	Rt-PCR	5'-GGGCTCTGGAGGAAAAGAAAAGG-3' 5'-TCCGTTACACACTTTGCGGC-3'	Kollektiv enthält nur Larynxkarzinome (gefrorenes Frischgewebe)	Yang et al. [Yang et al., 2009]
18 % (9 von 49)	USA (Pittsburgh)	Rt-PCR	5'-CTCTGGAGGAAAAGAAAAGGTAA-3' 5'-AGGCCCTTCGCACTTCTTAC-3'	Gefrorenes Frischgewebe	Wheeler et al. [Wheeler et al., 2012]
20,7 % (6 von 29)	Tschechische Republik	Rt-PCR	5'-AGTCGGGCTCTGGAGGAA-3' 5'-GCCGTCTTCTCCATCTCATA-3'	Gefrorenes Frischgewebe	Smilek et al. [Smilek et al., 2012]
23 % (12 von 52)	USA (Pittsburgh)	Rt-PCR und cDNA Sequenzierung	5'-ATGCGACCCTCCGGGACG-3' 5'-ATTCCGTTACACACTTTGCGGC-3' ≙ Primer 4 (236 bp)	Gefrorenes Frischgewebe	Wheeler et al. [Wheeler et al., 2012]
[36 % (9 von 25)]	USA (Pittsburgh)	Rt-PCR und cDNA Sequenzierung	5'-ATGCGACCCTCCGGGACG-3' 5'-ATTCCGTTACACACTTTGCGGC-3' ≙ Primer 4 (236 bp)	Kein repräsentatives Kollektiv, da Vorauswahl (12 Fälle mit und 13 Fälle ohne EGFR-Genamplifikation, gefrorenes Frischgewebe)	Wheeler et al. [Wheeler et al., 2015]
42 % (14 von 33)	USA (Pittsburgh)	Immunhistochemie (L8A4 Antikörper) und rt-PCR	5'-ATGCGACCCTCCGGGACG-3' 5'-ATTCCGTTACACACTTTGCGGC-3' ≙ Primer 4 (236 bp)	FFPE zur Immunhistochemie Rt-PCR mit gefrorenem Frischgewebe von 30 Fällen lediglich zur Bestätigung	Sok et al. [Sok et al., 2006]
42 % (22 von 53)	Kanada (Toronto)	Rt-PCR	Nicht publiziert	FFPE	Chau et al. [Chau et al., 2011]
80 % (insges. 17 % hohe Expression)	Deutschland	Immunhistochemie (L8A4 Antikörper) und rt-PCR zur stichprobenartigen Validierung	Primer veröffentlicht durch Yoshimoto et al. [Yoshimoto et al., 2008]	FFPE-Material; Yoshimoto et al. beschreiben zwei Primer	Tinhofer et al. [Tinhofer et al., 2011]

Tabelle 34: EGFRvIII-Häufigkeit bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches laut verschiedener Publikationen.

6.2 Herausforderungen im Rahmen des experimentellen Arbeitens mit EGFRvIII

Die Arbeit mit EGFRvIII bietet spezielle Herausforderungen. So verlieren traditionelle Zelllinien in Kultur durch eine noch nicht abschließend verstandene in vitro Negativselektion ihre natürliche

EGFR-Genamplifikation und ihre EGFR-Mutationen und somit auch ihre EGFRvIII-Mutation [Boeckx et al., 2014, Gan et al., 2013, Humphrey et al., 1988, Pandita et al., 2004]. Es ist somit nötig klassische Zelllinien mit EGFRvIII zu transfizieren. Lediglich bei Kultur von Glioblastomzellen als Neosphären in dreidimensionalen Kulturen mit speziellem Medium konnte die Verhinderung einer Negativselektion und damit die Erhaltung natürlicher EGFR-Veränderungen gezeigt werden [Witusik-Perkowska et al., 2011]. Alternativ können natürliche EGFR-Veränderungen bei in vivo Experimenten [Humphrey et al., 1988] erhalten werden.

Auch der Nachweis von EGFRvIII in Tumorgewebe ist herausfordernd. Es sind zahlreiche spezifische monoklonale Antikörper gegen EGFRvIII beschrieben, welche den immunhistochemischen Nachweis der Proteinexpression von EGFRvIII ermöglichen. Allerdings sind diese, aufgrund von bestehenden Patenten und laufenden Lizenzen, kaum verfügbar [Gan et al., 2013, Yoshimoto et al., 2008] und es gibt bei einigen dieser Antikörper Zweifel an der Spezifität [Gan et al., 2013].

Als alternative Nachweismethode von EGFRvIII steht die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) bzw. die Reverse Transkriptase-PCR (rt-PCR) zum Nachweis von entsprechender EGFRvIII-Boten-RNA (engl. messenger RNA, mRNA) zur Verfügung. Hierbei ist wiederum problematisch, dass der Nachweis von EGFRvIII-Transkripten nicht unbedingt mit relevanten EGFRvIII-Proteinmengen korreliert. So gibt Gan et al. [Gan et al., 2013] zusammenfassend an, dass bei einem Nachweis von EGFRvIII-Transkripten mittels rt-PCR in etwa 0 bis 63 % kein EGFRvIII-Proteinnachweis gelingt [Feldkamp et al., 1999, Gan et al., 2013, Ge et al., 2002, Ji et al., 2006, Saikali et al., 2007, Wikstrand et al., 1995]. Hierbei wurden Lungen-, Mammakarzinome und Glioblastome untersucht. Als mögliche Erklärung wird meist die Vermutung geäußert, dass die rt-PCR eine höhere Sensitivität als der immunhistochemische Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper haben könnte. Als weitere Erklärung wird angebracht, dass rt-PCR und Immunhistochemie aus unterschiedlichen Tumoranteilen durchgeführt worden sein könnten. Auch die fehlende Translation von vorhandener EGFRvIII-mRNA könnte ein Grund für die Diskrepanz sein.

Es stellt sich letztendlich die Frage, ab wann man vom Vorhandensein von EGFRvIII ausgehen kann. Gan et al. [Gan et al., 2013] erwähnen daher, dass sowohl eine auf PCR basierende Methode zum Nachweis von EGFRvIII-Transkripten als auch mindestens eine Protein-Nachweismethode verwendet werden sollten, um bei übereinstimmenden Ergebnissen vom Vorhandensein von EGFRvIII ausgehen zu können. Als Protein-Nachweismethoden eignen sich dabei die Immunhistochemie sowie die Durchflusszytometrie (engl. fluorescence activated cell sorting, FACS). Western Blots scheinen hier kein geeignetes Nachsverfahren zu sein [Gan et al., 2013].

6.3 Diskussion der Ergebnisse

Der Frage nach der Häufigkeit der Expression von EGFRvIII wurde in dieser Arbeit mittels rt-PCR, Agarose-Gelelektrophorese, Sequenzierung und Immunhistochemie nachgegangen. Festzustellen war, dass fünf in der Literatur vorbeschriebene Primer für die rt-PCR sehr unterschiedliche Ergebnisse zeigten, sodass eine Sequenzierung ergänzt wurde. Es wurden insgesamt 13 von 149 Fällen mittels Sequenzierung als EGFRvIII positiv bewertet. Es konnte allerdings nur ein Fall identifiziert werden, der mit allen fünf Primern erkannt wurde. Dieser Fall war zudem der einzige Fall, bei dem ein Nachweis von EGFRvIII mittels Immunhistochemie und damit der Nachweis einer Proteinexpression gelang.

Der Nachweis von EGFRvIII scheint also vom verwendeten Primer abhängig zu sein, was die unterschiedlichen Angaben in der Literatur erklären könnte. Auch werden tendenziell mehr Fälle bei weniger lange gelagertem FFPE Gewebe oder bei Frischgewebe erkannt. Unter 113 FFPE Gewebeproben, die alle mindestens zwei Jahre gelagert wurden, wurden nach Sequenzierung 4,4 % (5 von 113) als

EGFRvIII positiv gewertet, wohingegen unter 26 FFPE Gewebeproben, die alle weniger als zwei Jahre gelagert wurden, 19,2 % (5 von 26) identifiziert wurden. Bei Frischgewebe waren es unter zehn Fällen sogar 30 % (3 von 10). Einschränkend ist hier allerdings zu beachten, dass es sich bei den beiden ergänzten Kollektiven um Kollektive mit sehr geringen Fallzahlen handelt. Außerdem handelt es sich bei dem mittels aller fünf Primer, Sequenzierung und Immunhistochemie detektierten Fall um 17 Jahre gelagertes FFPE Gewebematerial.

Eine Erklärung für die häufigere Detektion von EGFRvIII bei weniger lange gelagertem FFPE Gewebe oder bei Frischgewebe scheint naheliegend, da lange Lagerung und Fixierung potenziell zur Fragmentierung von RNA beitragen können. Zwar zeigen aktuelle Untersuchungen, dass FFPE Gewebeproben auch bei längerer Lagerung, bis zu 60 Monaten, gut für die RNA Extraktion geeignet sind [Haynes et al., 2018], jedoch sinkt die RNA Qualität mit zunehmendem Alter der Gewebeproben signifikant [Stewart et al., 2011]. Mit zunehmendem Alter der Gewebeproben steigt die Wahrscheinlichkeit einer möglichen RNA Fragmentierung. So sind zudem zunehmend erfolgte Manipulationen an den Gewebeproben und eine zunehmende oberflächliche Oxidation zu erwarten. In dieser Arbeit wurden darüber hinaus auch Gewebeproben verwendet, die deutlich länger als 60 Monate gelagert wurden.

Warum allerdings unterschiedliche Primer bei Anwendung auf dieselbe isolierte RNA unterschiedliche Ergebnisse liefern, ist nicht eindeutig zu klären. Eine nicht auszuschließende Tumorerogenität könnte lediglich für abweichende Ergebnisse von rt-PCR und Immunhistochemie verantwortlich sein, da hierzu nicht identische Schnitte verwendet werden. Für unterschiedliche Ergebnisse der unterschiedlichen Primer ist dies jedoch kaum eine Erklärung, da dazu dieselbe isolierte RNA verwendet wurde. Die unterschiedlichen Primer könnten andererseits unterschiedlich gut für das verwendete Probenmaterial geeignet sein bzw. generell unterschiedliche Sensitivitäten aufweisen. Hierbei würde man allerdings erwarten, dass ein Primer deutlich mehr Fälle erkennt als ein anderer Primer, nicht jedoch, dass unterschiedliche Fälle erkannt werden. Einen weiteren Einfluss könnten sogenannte Off-Target-Effekte eine Rolle spielen. Speziell bei fraglich spezifischen Banden und bei Fällen, bei denen keine Bestätigung mittels Sequenzierung möglich war, ist dies wahrscheinlich.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Primer scheinen die vorhandene Diskrepanz der Angaben in der Literatur über das Vorkommen von EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopfhals-Bereiches erklären zu können. Darüber hinaus sind andere Untersuchungen lediglich mittels Immunhistochemie und hierbei wiederum mit unterschiedlichen Antikörpern erfolgt, was eine Vergleichbarkeit erschwert. Ebenfalls nicht auszuschließen ist, dass neben unterschiedlicher Fixierung, die verwendeten Kollektive eventuell deutlich unterschiedliche Lagerungszeiten zum Zeitpunkt der Untersuchung aufwiesen.

Die beobachtete Diskrepanz zwischen rt-PCR und Immunhistochemie könnte, wie bereits erwähnt, durch eine mögliche Tumorerogenität erklärbar sein. Es wurden allerdings unmittelbar aufeinanderfolgende Gewebeschnitte für die RNA Isolierung und Immunhistochemie verwendet, was dies unwahrscheinlich macht. Die Immunhistochemie könnte allerdings weniger sensitiv sein, als die etablierte rt-PCR. Die wahrscheinlichste Erklärung ist jedoch, dass die spezifische EGFRvIII-RNA vorhanden ist, es jedoch in vielen Fällen zu keiner Proteinexpression kommt. Die Proteinexpression könnte in diesen Fällen auch lediglich derart gering sein, dass ein immunhistochemischer Nachweis nicht möglich ist. Hierbei stellt sich nun die Frage, ab wann ein Nachweis von EGFRvIII relevant ist. Eventuell ist erst eine entsprechende Proteinexpression von Bedeutung. Wie erwähnt, wurde bereits durch Gan et al. [Gan et al., 2013] angemerkt, dass sowohl eine auf PCR basierende Methode zum Nachweis von EGFRvIII-Transkripten als auch mindestens eine Protein-Nachweismethode verwendet werden sollten, um bei übereinstimmenden Ergebnissen vom Vorhandensein von EGFRvIII ausgehen zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können dies bestätigen. Es bleibt also festzuhalten, dass zukünftige Untersuchungen nicht ausschließlich auf eine Nachweismethode basieren sollten. Insbesondere sollte dies gelten, wenn der Nachweis von EGFRvIII potenziell therapieentscheidend sein könnte. Rt-PCR, Sequenzierung und Immunhistochemie sollten für verlässliche und vergleichbare Ergebnisse kombiniert werden.

Dies sollte zudem nicht nur für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches gelten. Seit der Erstbeschreibung von EGFRvIII bei Glioblastomen im Jahr 1990 [Zhang et al., 2010] wurde das Vorhandensein von EGFRvIII auch an diversen anderen extrakraniellen Tumorentitäten untersucht. Wie beschrieben, bestehen hier meist ebenfalls sehr uneinheitliche und teilweise widersprüchliche Angaben über die Häufigkeit von EGFRvIII. Vor allem die Herangehensweise mit nur einer Nachweismethode muss auch hier kritisch gesehen werden und scheint allgemein bei extrakraniellen Tumorentitäten problematisch. Beispielhaft sei erneut erwähnt, dass Moscatello et al. [Moscatello et al., 1995] 1995 publizierten, dass in 75 % der untersuchten Ovarialkarzinome EGFRvIII nachweisbar sei. Diese Angabe stützte sich allerdings nur auf Western Blot Analysen mit einem spezifischen EGFRvIII-Antikörper. Andere Forschungsgruppen konnten dies unter Verwendung mehrerer Nachweismethoden nicht reproduzieren und so wird aktuell sogar davon ausgegangen, dass EGFRvIII bei Ovarialkarzinomen nicht existent ist [de Graeff et al., 2008, Gan et al., 2013, Jungbluth et al., 2003, Lassus et al., 2006, Rae et al., 2004, Steffensen et al., 2008]. Die vorhandenen Angaben über das Vorkommen von EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches variieren, wie erwähnt, mit 0 bis 80 % noch stärker (Tabelle 34, Seite 54). Angaben über 80 % stammen von Tinhofer et al. aus dem Jahr 2011 [Tinhofer et al., 2011] und basieren auf immunhistochemischen Färbungen mit dem EGFRvIII-Antikörper L8A4 und stichprobenartiger Validierung mittels rt-PCR. Melchers et al. publizierten 2014 hingegen, dass EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches nicht vorkommt [Melchers et al., 2014]. Unter Anwendung von rt-PCR und Immunhistochemie konnten sie unter 531 Fällen keinen EGFRvIII positiven Fall nachweisen.

In dieser Arbeit hingegen konnte EGFRvIII eindeutig nachgewiesen werden. In 13 von 149 Fällen konnte EGFRvIII mittels rt-PCR und Sequenzierung detektiert werden. Allerdings war es nur in einem Fall möglich, EGFRvIII mit allen Primern nachzuweisen. Dieser Fall war auch der einzige Fall, bei dem eine EGFRvIII-Proteinexpression mittels Immunhistochemie nachgewiesen wurde.

Was allerdings nicht nachgewiesen werden konnte, ist eine prognostische Bedeutung von EGFRvIII. Ein Unterschied in der Verteilung der Überlebenszeiten von Patienten, bei denen EGFRvIII nachgewiesen wurde, und den übrigen Patienten konnte nicht gezeigt werden.

In dieser Konstellation, mit geringer Expression von EGFRvIII, nur einem Fall mit nachgewiesener Proteinexpression und nicht nachweisbarer prognostischer Relevanz, scheint die Bedeutung von EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches insgesamt fraglich. Zudem zeigen Untersuchungen unserer Forschungsgruppe, dass EGFRvIII transfizierte Zelllinien im Vergleich zu nicht transfizierten Zelllinien keine erhöhte Strahlenresistenz oder verstärkte Resistenz gegen zielgerichtete Therapien, wie den monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab oder die Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib und Tyrphostin AG1478, aufweisen [Koch et al., 2017].

7 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Epidermal Growth Factor Receptor Variante III (EGFRvIII) kann bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches nachgewiesen werden. Unter Anwendung der rt-PCR mit fünf verschiedenen Primern und Ergänzung von Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung war es möglich, bei 149 Fällen in 13 Gewebeproben die spezifische EGFRvIII-Basensequenz nachzuweisen. Der Vergleich des Gesamtüberlebens dieser, als EGFRvIII positiv identifizierten Patienten, mit den übrigen Patienten ergab keinen Anhalt für einen Einfluss von EGFRvIII auf das Gesamtüberleben.

Zu betonen ist, dass lediglich in einem einzigen Fall die Proteinexpression von EGFRvIII mittels Immunhistochemie nachgewiesen wurde. Interessanterweise war dieser Fall der einzige Fall, der durch alle fünf verwendeten Primer detektiert wurde. Bei allen anderen Fällen zeigten die verwendeten Primer sehr inhomogene Ergebnisse. Auch wurde EGFRvIII tendenziell in weniger lange gelagertem FFPE Gewebe und in Frischgewebe häufiger nachgewiesen. Allerdings gab es auch bei diesem Gewebe keinen weiteren Fall, bei dem ein Nachweis mittels aller angewandten Primer möglich war.

Diese inhomogenen Ergebnisse der verschiedenen Primer und die Abhängigkeit von Alter und Fixierungsart der Gewebeproben könnten Ursachen für die uneinheitlichen Angaben in der Literatur über das Vorkommen von EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches sein. Zukünftige Untersuchungen sollten daher nicht ausschließlich auf einer Nachweismethode basieren. Rt-PCR mit mehreren Primern, Sequenzierung und Immunhistochemie sollten für verlässliche und vergleichbare Ergebnisse kombiniert werden.

Letztendlich scheint die Relevanz von EGFRvIII bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches fraglich. So zeigen Untersuchungen unserer Forschungsgruppe, dass EGFRvIII transfizierte HNSCC Zelllinien im Vergleich zu nicht transfizierten Zelllinien keine erhöhte Strahlenresistenz oder verstärkte Resistenz gegen zielgerichtete Therapien, wie den monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab (Erbix[®], Merck, Darmstadt, Deutschland) oder die Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib und Tyrphostin AG1478, aufweisen. Zudem scheinen, wie in dieser Arbeit dargestellt, die Häufigkeit des Vorkommens von EGFRvIII gering und die prognostische Relevanz nicht vorhanden zu sein. Dies gilt insbesondere, wenn beachtet wird, dass in dieser Arbeit lediglich ein Fall von 149 durch alle Methoden eindeutig als EGFRvIII positiv mit Proteinexpression bewertet werden konnte.

8 Summary and Conclusion

The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) can be detected in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Using rt-PCR with five different primers and conducting agarose-gel electrophoresis and sequencing in addition, it was possible to detect the specific EGFRvIII nucleic acid sequence in 13 of 149 tissue samples. The overall survival of these detected 13 patients compared to the overall survival of the remaining patients did not show any influence of EGFRvIII.

Moreover, one has to stress, that only one single case showed protein expression when using immunohistochemical EGFRvIII staining. Remarkably, this was the only case which was detected as EGFRvIII positive by all five primers. In all other cases, the primers showed inconsistent results. Furthermore, there was a trend to more EGFRvIII detection in short-time stored FFPE and especially in fresh or fresh frozen tissue. However, there was no additional tissue that was detected EGFRvIII positive with all used primers in short-time stored FFPE and fresh or fresh frozen tissue.

These inconsistent results of different primers and the influence of storage time and fixation of tissue could be reason for inconsistent data in literature about the EGFRvIII prevalence in HNSCC. Future examinations should therefore not only rely on one detection method. Rt-PCR with more than one primer, sequencing and immunohistochemical staining should be combined to achieve reliable and comparable results.

Finally, the relevance of EGFRvIII in HNSCC seems highly questionable. Experimental data of our research group show that EGFRvIII transfected HNSCC cell lines compared to their non-transfected equivalents do not present more radioresistant or more resistant to targeted therapies like the monoclonal EGFR -antibody Cetuximab (Erbix[®], Merck, Darmstadt, Germany) or the tyrosine kinase inhibitors Gefitinib and Tyrophostin AG1478. Moreover, the presented data show a low EGFRvIII prevalence and no prognostic relevance of EGFRvIII positivity. This becomes particularly clear, when considering that there was just one case in 149 that was detected clearly by all methods to be EGFRvIII positive with protein expression.

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.	Arteria, lateinisch für Arterie
Age.	Agarose-Gelelektrophorese
AKT	PKB/AKT: Proteinkinase B (AKT-Gen kodiert Proteinkinase B)
AREG	Amphiregulin
bp	Basenpaar
bzgl.	Bezüglich
C	Cytosin
c-Cbl	c-Casitas B-lineage Lymphoma
CDK	Cyclin-dependent kinase, engl. für Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	Complementary DNA, engl. für komplementäre Desoxyribonukleinsäure
conc.	Concentrated, engl. für konzentriert
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid, engl. für Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFRvIII	Epidermal Growth Factor Receptor Variante III bzw. Epidermal Growth Factor Receptor variant III
engl.	Englisch
EPR	Epiregulin
ErbB	Erythroblastosis oncogene B
ERK	Extracellular-signal regulated kinase, zählt zu den Mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK)
FACS	Fluorescence activated cell sorting, engl. für Durchflusszytometrie

FBS	Fetal bovin serum, engl. für fetales Kälberserum
FDA	US Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-fixed and paraffin-embedded, engl. für Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
for.	Forward
FOX	Forkhead transcription factor family
G	Guanin
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HNSCC	Head and neck squamous cell cancer
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horse radish peroxidase, engl. für Meerrettichperoxidase
JAK	Janus kinase, engl. für Januskinase
KLH	Keyhole limpet hemocyanin, engl. für Schlitzschnecken-Hämocyanin
KRAS	Kirsten Rat sarcoma protein
kum.	Kumulativ
MAPK	Mitogen activated protein kinase, engl. für Mitogen-aktivierte Kinase, MAP-Kinase
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase, auch MAP2K
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase, auch MAP3K
MEK	Bezeichnung für eine MAP-Kinase-Kinase (MAP2K)
MMAF	Monomethyl auristatin F
mRNA	Messenger RNA, engl. für Boten-RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
n.a.	Nicht auswertbar
neg.	Negativ
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NSCLC	Non small cell lung cancer, engl. für nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
NRAS	Neuroblastoma Rat sarcoma protein

PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death protein 1 corresponding ligand 1
PCR	Polymerase chain reaction, engl. für Polymerase-Kettenreaktion
PKB/AKT	Proteinkinase B (AKT-Gen kodiert Proteinkinase B)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
pos.	Positiv
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction, engl. für quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma, eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K)
RAS	Rat sarcoma protein
Rev.	Reverse
RNA	Ribonucleic acid, engl. für Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute, engl. für Umdrehungen pro Minute
RNase	Ribonuklease
rt-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction, engl. für reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion
SCCHN	Squamous cell carcinoma of the head and neck
SCLC	Small cell lung cancer, engl. für kleinzelliges Lungenkarzinom
SNSCC	Sinonasal squamous cell cancer
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
T	Thymin
TGF α	Transforming growth factor alpha
TM	Transmembrandomäne
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UD5	UD-SCC-5 (Bezeichnung einer Zelllinie)
wtEGFR	Wildtyp Epidermal Growth Factor Receptor

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Therapie des rezidivierten oder fernmetastasierten Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches; modifiziert nach Argiris et al. [Argiris et al., 2017].	13
Abbildung 2: Tumorprogressionsmodell; modifiziert nach Perez-Ordoñez et al. [Perez-Ordonez et al., 2006]; basierend auf Califano et al. [Califano et al., 1996].	15
Abbildung 3: EGFR (links); Aktivierung von EGFR durch Dimerisierung nach Ligandenbindung und nachgeschaltete Signalwege (Mitte); Einfluss von EGFR-Antikörpern (rechts); modifiziert nach Martinez-Useros et al. [Martinez-Useros and Garcia-Foncillas, 2015], Sharafinski et al. [Sharafinski et al., 2010] und Gan et al. [Gan et al., 2013].	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Entstehungsmechanismus von EGFRvIII durch Deletion von Exon 2 bis Exon 7; TM für Transmembrandomäne; modifiziert nach Reiter und Maihle [Reiter and Maihle, 1996] und Khattri et al. [Khattri et al., 2014].	20
Abbildung 5: EGFRvIII und nachgeschaltete Signalwege; modifiziert nach Martinez-Useros et al. [Martinez-Useros and Garcia-Foncillas, 2015].	22
Abbildung 6: Herstellerdarstellung der DNA-Leitern peqGOLD 100 bp (links) und peqGOLD Ultra Low Range II (rechts); aus Datenblättern der DNA-Leitern des Herstellers PEQLAB, Erlangen, Deutschland.	38
Abbildung 7: Glioblastomgewebe (Präparat 6G), EGFRvIII positiv; erstellt mit PreciPoint M8 Mikroskop.	40
Abbildung 8: EGFRvIII positives Plattenepithelkarzinom Fall 4J (links); EGFRvIII negatives Plattenepithelkarzinom Fall 42 (rechts); erstellt mit PreciPoint M8 Mikroskop.	41
Abbildung 9: Schmelzkurven (links) nach Amplifizierung von cDNA eines EGFRvIII positiven Glioblastoms mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen unter Verwendung des Primers 1 und Agarose-Gelelektrophorese (rechts) im Rahmen der Etablierung des Primers.	41
Abbildung 10: Schmelzkurven (links) nach Amplifizierung von cDNA eines EGFRvIII positiven und eines EGFRvIII negativen Glioblastoms unter Verwendung des Primers 1 und Agarose-Gelelektrophorese (rechts).	42
Abbildung 11: Agarose-Gelelektrophorese von mittels fünf verschiedener Primer amplifizierter cDNA eines EGFRvIII positiven Glioblastoms (links) und eines EGFRvIII Plasmids (rechts).	43
Abbildung 12: Agarose-Gelelektrophorese von mittels unterschiedlicher Primer amplifizierter cDNA von vier verschiedenen Zelllinien (UD5 vIII, UD5, Cal27 und Cal27 vIII).	43
Abbildung 13: Agarose-Gelelektrophorese von mittels fünf verschiedener Primer amplifizierter cDNA des Falls 4J und zwei weiterer Fälle.	44
Abbildung 14: Agarose-Gelelektrophorese von mittels wtEGFR-Primer amplifizierter cDNA.	45
Abbildung 15: Schematische Darstellung der spezifischen EGFRvIII-Fusionssequenz; DNA-Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T); modifiziert nach Khattri et al. [Khattri et al., 2014].	45
Abbildung 16: Sequenzierungsergebnis Glioblastomgewebe 6G; Fusionssequenz der Exone 1 und 8 (Primer 5 forward).	45
Abbildung 17: Sequenzierungsergebnis Plattenepithelkarzinom 4J; Fusionssequenz der Exone 1 und 8 (Primer 5 forward).	46
Abbildung 18: Darstellung der relativen Häufigkeiten des EGFRvIII-Nachweises mittels Sequenzierung in den drei beschriebenen Kollektiven; entsprechende Prozentangaben sind in den einzelnen Balken angegeben; erstellt mit SPSS Statistics.	49
Abbildung 19: Kreuztabelle mit absoluten Häufigkeiten des EGFRvIII-Nachweises mittels Sequenzierung in den drei beschriebenen Kollektiven und Angabe der erwarteten Häufigkeiten; erstellt mit SPSS Statistics.	49

Abbildung 20: Überlebensfunktion des Gesamtkollektivs basierend auf den Kaplan-Meier-Schätzer; erstellt mit SPSS Statistics.	50
Abbildung 21: Überlebensfunktion der mittels Sequenzierung als EGFRvIII positiv gewerteten Fälle (rot) im Vergleich zum übrigen Gesamtkollektiv (blau); Überlebensfunktion basierend auf den Kaplan-Meier-Schätzer; erstellt mit SPSS Statistics.	51
Abbildung 22: Log Rank Test auf Gleichheit der Überlebensfunktionen der mittels Sequenzierung als EGFRvIII positiv gewerteten Fälle im Vergleich zum übrigen Gesamtkollektiv; erstellt mit SPSS Statistics.	51

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: M-Fernmetastasen nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].....	5
Tabelle 2: R-Residualtumor nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].....	5
Tabelle 3: G-Histopathologisches Grading nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010]..	6
Tabelle 4: N-Regionäre Lymphknoten nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].	6
Tabelle 5: T-Primärtumor Lippen und Mundhöhle nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].....	6
Tabelle 6: Stadiengruppierung Lippen und Mundhöhle nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].	7
Tabelle 7: T-Primärtumor Oropharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].....	7
Tabelle 8: T-Primärtumor Nasopharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].....	7
Tabelle 9: N-Regionäre Lymphknoten Nasopharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].	7
Tabelle 10: T-Primärtumor Hypopharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010]. ..	7
Tabelle 11: Stadiengruppierung Oro- und Hypopharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].	8
Tabelle 12: Stadiengruppierung Nasopharynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].....	8
Tabelle 13: T-Primärtumor Supraglottis nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].....	8
Tabelle 14: T-Primärtumor Glottis nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].	8
Tabelle 15: T-Primärtumor Subglottis nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].....	9
Tabelle 16: Stadiengruppierung Larynx nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].	9
Tabelle 17: T-Primärtumor Kieferhöhle Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].....	9
Tabelle 18: T-Primärtumor Nasenhöhle und Siebbeinzellen nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].	9
Tabelle 19: Stadiengruppierung Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen nach Wittekind und Meyer [Wittekind and Meyer, 2010].	10
Tabelle 20: Kollektivcharakterisierung, Kollektiv aus 113 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.	25
Tabelle 21: Kollektivcharakterisierung, Kollektiv aus 26 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.	26
Tabelle 22: Kollektivcharakterisierung, Kollektiv aus zehn Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.	26
Tabelle 23: Kollektivcharakterisierung, Gesamtkollektiv aus 149 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.	27
Tabelle 24: Verwendete Kits.	28
Tabelle 25: Verwendete Reagenzien.	28
Tabelle 26: Verwendete Geräte.	29
Tabelle 27: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	29
Tabelle 28: Verwendete Computerprogramme.	29
Tabelle 29: PCR-Primer Sequenzen (unterstrichene Sequenz überlappt die Fusionsstelle von Exon 1 und Exon 8).	30
Tabelle 30: PCR-Primer Annealingtemperaturen und Amplifikatlängen.	30
Tabelle 31: Ergebnisse von rt-PCR, Agarose-Gelelektrophorese (Age.) und Sequenzierung des Kollektivs aus 113 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches; es sind lediglich Fälle dargestellt, bei denen ein positives Ergebnis bei mindestens einer Methode zu beobachten war.....	47
Tabelle 32: Ergebnisse von rt-PCR, Agarose-Gelelektrophorese (Age.) und Sequenzierung des Kollektivs aus 26 Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.	48

Tabelle 33: Ergebnisse von rt-PCR, Agarose-Gelelektrophorese (Age.) und Sequenzierung des Kollektivs aus Frischgewebe von zehn Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.	48
Tabelle 34: EGFRvIII-Häufigkeit bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches laut verschiedener Publikationen.....	54

12 Literaturverzeichnis

Aldape, K. D., Ballman, K., Furth, A., Buckner, J. C., Giannini, C., Burger, P. C., Scheithauer, B. W., Jenkins, R. B. and James, C. D., 2004, *Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63 (7): 700-707.

Ang, K. K., Berkey, B. A., Tu, X., Zhang, H. Z., Katz, R., Hammond, E. H., Fu, K. K. and Milas, L., 2002, *Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma*. *Cancer Res*, 62 (24): 7350-7356.

Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tan, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P. and Gillison, M. L., 2010, *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. *N Engl J Med*, 363 (1): 24-35. DOI: 10.1056/NEJMoa0912217.

Argiris, A., Harrington, K. J., Tahara, M., Schulten, J., Chomette, P., Ferreira Castro, A. and Licitra, L., 2017, *Evidence-Based Treatment Options in Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck*. *Front Oncol*, 7 (72): 1-14. DOI: 10.3389/fonc.2017.00072.

Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D. and Ferris, R. L., 2008, *Head and neck cancer*. *Lancet*, 371 (9625): 1695-1709. DOI: 10.1016/s0140-6736(08)60728-x.

Arteaga, C. L., 2002, *Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia*. *Semin Oncol*, 29 (5 Suppl 14): 3-9. DOI: 10.1053/sonc.2002.35642.

Arteaga, C. L. and Engelman, J. A., 2014, *ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics*. *Cancer Cell*, 25 (3): 282-303. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.02.025.

Azuma, M., Danenberg, K. D., Iqbal, S., El-Khoueiry, A., Zhang, W., Yang, D., Koizumi, W., Saigenji, K., Danenberg, P. V. and Lenz, H. J., 2006, *Epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor receptor variant III gene expression in metastatic colorectal cancer*. *Clin Colorectal Cancer*, 6 (3): 214-218. DOI: 10.3816/CCC.2006.n.038.

Baselga, J., Trigo, J. M., Bourhis, J., Tortochaux, J., Cortes-Funes, H., Hitt, R., Gascon, P., Amellal, N., Harstrick, A. and Eckardt, A., 2005, *Phase II multicenter study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck*. *J Clin Oncol*, 23 (24): 5568-5577. DOI: 10.1200/jco.2005.07.119.

Bhattacharyya, T. and Kainickal, C. T., 2018, *Current Status of Organ Preservation in Carcinoma Larynx*. *World J Oncol*, 9 (2): 39-45. DOI: 10.14740/wjon1105w.

Biernat, W., Huang, H., Yokoo, H., Kleihues, P. and Ohgaki, H., 2004, *Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas*. *Brain Pathol*, 14 (2): 131-136.

Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Winn, D. M., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J. B., Stemhagen, A. and Fraumeni, J. F., Jr., 1988, *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. *Cancer Res*, 48 (11): 3282-3287.

Boeckx, C., Op de Beeck, K., Wouters, A., Deschoolmeester, V., Limame, R., Zwaenepoel, K., Specenier, P., Pauwels, P., Vermorken, J. B., Peeters, M., Van Camp, G., Baay, M. and Lardon, F., 2014, *Overcoming cetuximab resistance in HNSCC: the role of AURKB and DUSP proteins*. *Cancer Lett*, 354 (2): 365-377. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.08.039.

- Boeckx, C., Weyn, C., Vanden Bempt, I., Deschoolmeester, V., Wouters, A., Specenier, P., Van Laer, C., Van den Weyngaert, D., Kockx, M., Vermorken, J. B., Peeters, M., Pauwels, P., Lardon, F. and Baay, M., 2014, *Mutation analysis of genes in the EGFR pathway in Head and Neck cancer patients: implications for anti-EGFR treatment response*. BMC Res Notes, 7 (337). DOI: 10.1186/1756-0500-7-337.
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S., Baselga, J., Youssoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K. and Ang, K. K., 2006, *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 354 (6): 567-578. DOI: 10.1056/NEJMoa053422.
- Bose, P., Brockton, N. T. and Dort, J. C., 2013, *Head and neck cancer: from anatomy to biology*. Int J Cancer, 133 (9): 2013-2023. DOI: 10.1002/ijc.28112.
- Brennan, J. A., Boyle, J. O., Koch, W. M., Goodman, S. N., Hruban, R. H., Eby, Y. J., Couch, M. J., Forastiere, A. A. and Sidransky, D., 1995, *Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 332 (11): 712-717. DOI: 10.1056/nejm199503163321104.
- Britt, C. J. and Gourin, C. G., 2017, *Contemporary management of advanced laryngeal cancer*. Laryngoscope Investig Otolaryngol, 2 (5): 307-309. DOI: 10.1002/lio2.85.
- Budach, W., Bolke, E., Kammers, K., Gerber, P. A., Orth, K., Gripp, S. and Matuschek, C., 2016, *Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC): A meta-analysis of randomized trials*. Radiother Oncol, 118 (2): 238-243. DOI: 10.1016/j.radonc.2015.10.014.
- Burtness, B., Goldwasser, M. A., Flood, W., Mattar, B. and Forastiere, A. A., 2005, *Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study*. J Clin Oncol, 23 (34): 8646-8654. DOI: 10.1200/jco.2005.02.4646.
- Byers, R. M., El-Naggar, A. K., Lee, Y. Y., Rao, B., Fornage, B., Terry, N. H., Sample, D., Hankins, P., Smith, T. L. and Wolf, P. J., 1998, *Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue?* Head Neck, 20 (2): 138-144.
- Byers, R. M., Weber, R. S., Andrews, T., McGill, D., Kare, R. and Wolf, P., 1997, *Frequency and therapeutic implications of "skip metastases" in the neck from squamous carcinoma of the oral tongue*. Head Neck, 19 (1): 14-19.
- Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W. and Sidransky, D., 1996, *Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization*. Cancer Res, 56 (11): 2488-2492.
- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekruze, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S. and Gillison, M. L., 2011, *Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States*. J Clin Oncol, 29 (32): 4294-4301. DOI: 10.1200/jco.2011.36.4596.
- Chau, N. G. and Hammerman, P. S., 2016, *Heads Up! Predictive Gene Signatures in Head and Neck Cancer May Be Coming Soon*. Clin Cancer Res, 22 (15): 3710-3712. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-16-0582.
- Chau, N. G., Perez-Ordóñez, B., Zhang, K., Pham, N. A., Ho, J., Zhang, T., Ludkovski, O., Wang, L., Chen, E. X., Tsao, M. S., Kamel-Reid, S. and Siu, L. L., 2011, *The association between EGFR variant*

III, HPV, p16, c-MET, EGFR gene copy number and response to EGFR inhibitors in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck Oncol*, 3 (11). DOI: 10.1186/1758-3284-3-11.

Chen, A. Y. and Halpern, M., 2007, *Factors predictive of survival in advanced laryngeal cancer*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 133 (12): 1270-1276. DOI: 10.1001/archotol.133.12.1270.

Chen, J. R., Xu, H. Z., Yao, Y. and Qin, Z. Y., 2015, *Prognostic value of epidermal growth factor receptor amplification and EGFRvIII in glioblastoma: meta-analysis*. *Acta Neurol Scand*, 132 (5): 310-322. DOI: 10.1111/ane.12401.

Choe, G., Horvath, S., Cloughesy, T. F., Crosby, K., Seligson, D., Palotie, A., Inge, L., Smith, B. L., Sawyers, C. L. and Mischel, P. S., 2003, *Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo*. *Cancer Res*, 63 (11): 2742-2746.

Chu, C. T., Everiss, K. D., Wikstrand, C. J., Batra, S. K., Kung, H. J. and Bigner, D. D., 1997, *Receptor dimerization is not a factor in the signalling activity of a transforming variant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII)*. *Biochem J*, 324 (Pt 3): 855-861.

Cohen, E. E., Karrison, T. G., Kocherginsky, M., Mueller, J., Egan, R., Huang, C. H., Brockstein, B. E., Agulnik, M. B., Mittal, B. B., Yunus, F., Samant, S., Racz, L. E., Mehra, R., Kumar, P., Ondrey, F., Marchand, P., Braegas, B., Seiwert, T. Y., Villafior, V. M., Haraf, D. J. and Vokes, E. E., 2014, *Phase III randomized trial of induction chemotherapy in patients with N2 or N3 locally advanced head and neck cancer*. *J Clin Oncol*, 32 (25): 2735-2743. DOI: 10.1200/jco.2013.54.6309.

Cunningham, M. P., Essapen, S., Thomas, H., Green, M., Lovell, D. P., Topham, C., Marks, C. and Modjtahedi, H., 2005, *Coexpression, prognostic significance and predictive value of EGFR, EGFRvIII and phosphorylated EGFR in colorectal cancer*. *Int J Oncol*, 27 (2): 317-325.

de Graeff, P., Crijns, A. P., Ten Hoor, K. A., Klip, H. G., Hollema, H., Oien, K., Bartlett, J. M., Wisman, G. B., de Bock, G. H., de Vries, E. G., de Jong, S. and van der Zee, A. G., 2008, *The ErbB signalling pathway: protein expression and prognostic value in epithelial ovarian cancer*. *Br J Cancer*, 99 (2): 341-349. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604471.

Denaro, N., Russi, E. G., Adamo, V. and Merlano, M. C., 2014, *State-of-the-art and emerging treatment options in the management of head and neck cancer: news from 2013*. *Oncology*, 86 (4): 212-229. DOI: 10.1159/000357712.

Doescher, J., Veit, J. A. and Hoffmann, T. K., 2017, *[The 8th edition of the AJCC Cancer Staging Manual : Updates in otorhinolaryngology, head and neck surgery]*. *HNO*, 65 (12): 956-961. DOI: 10.1007/s00106-017-0391-3.

Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D. and Collins, V. P., 1992, *Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (10): 4309-4313.

Fearon, E. R. and Vogelstein, B., 1990, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, 61 (5): 759-767.

Feldkamp, M. M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L. and Guha, A., 1999, *Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens*. *Neurosurgery*, 45 (6): 1442-1453.

Felsberg, J., Hentschel, B., Kaulich, K., Gramatzki, D., Zacher, A., Malzkorn, B., Kamp, M., Sabel, M., Simon, M., Westphal, M., Schackert, G., Tonn, J. C., Pietsch, T., von Deimling, A., Loeffler, M., Reifenberger, G. and Weller, M., 2017, *Epidermal Growth Factor Receptor Variant III (EGFRvIII)*

Positivity in EGFR-Amplified Glioblastomas: Prognostic Role and Comparison between Primary and Recurrent Tumors. Clin Cancer Res, 23 (22): 6846-6855. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-17-0890.

Fung, C. and Grandis, J. R., 2010, *Emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck.* Expert Opin Emerg Drugs, 15 (3): 355-373. DOI: 10.1517/14728214.2010.497754.

Gan, H. K., Burgess, A. W., Clayton, A. H. and Scott, A. M., 2012, *Targeting of a conformationally exposed, tumor-specific epitope of EGFR as a strategy for cancer therapy.* Cancer Res, 72 (12): 2924-2930. DOI: 10.1158/0008-5472.Can-11-3898.

Gan, H. K., Cvrljevic, A. N. and Johns, T. G., 2013, *The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered.* Febs j, 280 (21): 5350-5370. DOI: 10.1111/febs.12393.

Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D. and Weiner, L. M., 1993, *Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas.* Cancer Res, 53 (14): 3217-3220.

Gasco, M. and Crook, T., 2003, *The p53 network in head and neck cancer.* Oral Oncol, 39 (3): 222-231.

Ge, H., Gong, X. and Tang, C. K., 2002, *Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis.* Int J Cancer, 98 (3): 357-361.

Giono, L. E. and Manfredi, J. J., 2006, *The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints.* J Cell Physiol, 209 (1): 13-20. DOI: 10.1002/jcp.20689.

Gonzalez, M. V., Pello, M. F., Lopez-Larrea, C., Suarez, C., Menendez, M. J. and Coto, E., 1995, *Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck.* Clin Cancer Res, 1 (9): 1043-1049.

Grandis, J. R., Zeng, Q., Drenning, S. D. and Tweardy, D. J., 1998, *Normalization of EGFR mRNA levels following restoration of wild-type p53 in a head and neck squamous cell carcinoma cell line.* Int J Oncol, 13 (2): 375-378.

Guimaraes, D. P. and Hainaut, P., 2002, *TP53: a key gene in human cancer.* Biochimie, 84 (1): 83-93.

Haddad, R., O'Neill, A., Rabinowits, G., Tishler, R., Khuri, F., Adkins, D., Clark, J., Sarlis, N., Lorch, J., Beitler, J. J., Limaye, S., Riley, S. and Posner, M., 2013, *Induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy (sequential chemoradiotherapy) versus concurrent chemoradiotherapy alone in locally advanced head and neck cancer (PARADIGM): a randomised phase 3 trial.* Lancet Oncol, 14 (3): 257-264. DOI: 10.1016/s1470-2045(13)70011-1.

Hama, T., Yuza, Y., Saito, Y., J, O. u., Kondo, S., Okabe, M., Yamada, H., Kato, T., Moriyama, H., Kurihara, S. and Urashima, M., 2009, *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma.* Oncologist, 14 (9): 900-908. DOI: 10.1634/theoncologist.2009-0058.

Han, W. and Lo, H. W., 2012, *Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations.* Cancer Lett, 318 (2): 124-134. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.01.011.

Han, W., Zhang, T., Yu, H., Foulke, J. G. and Tang, C. K., 2006, *Hypophosphorylation of residue Y1045 leads to defective downregulation of EGFRvIII.* Cancer Biol Ther, 5 (10): 1361-1368.

Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S. C., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B.,

- Herrero, R., Kelsey, K., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Lence, J. J., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., McClean, M. D., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A. F., Purdue, M., Rudnai, P., Schwartz, S. M., Smith, E., Sturgis, E. M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D. M., Shangina, O., Pilarska, A., Zhang, Z. F., Ferro, G., Berthiller, J. and Boffetta, P., 2009, *Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18 (2): 541-550. DOI: 10.1158/1055-9965.epi-08-0347.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. and Haupt, Y., 2003, *Apoptosis - the p53 network*. *J Cell Sci*, 116 (Pt 20): 4077-4085. DOI: 10.1242/jcs.00739.
- Haynes, H. R., Killick-Cole, C. L., Hares, K. M., Redondo, J., Kemp, K. C., Moutasim, K. A., Faulkner, C., Wilkins, A. and Kurian, K. M., 2018, *Evaluation of the quality of RNA extracted from archival FFPE glioblastoma and epilepsy surgical samples for gene expression assays*. *J Clin Pathol*, 71 (8): 695-701. DOI: 10.1136/jclinpath-2017-204969.
- Herbst, R. S., Arquette, M., Shin, D. M., Dicke, K., Vokes, E. E., Azarnia, N., Hong, W. K. and Kies, M. S., 2005, *Phase II multicenter study of the epidermal growth factor receptor antibody cetuximab and cisplatin for recurrent and refractory squamous cell carcinoma of the head and neck*. *J Clin Oncol*, 23 (24): 5578-5587. DOI: 10.1200/jco.2005.07.120.
- Hitt, R., Grau, J. J., Lopez-Pousa, A., Berrocal, A., Garcia-Giron, C., Irigoyen, A., Sastre, J., Martinez-Trufero, J., Brandariz Castelo, J. A., Verger, E. and Cruz-Hernandez, J. J., 2014, *A randomized phase III trial comparing induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy versus chemoradiotherapy alone as treatment of unresectable head and neck cancer*. *Ann Oncol*, 25 (1): 216-225. DOI: 10.1093/annonc/mdt461.
- Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S. and Cavenee, W. K., 1997, *The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling*. *J Biol Chem*, 272 (5): 2927-2935.
- Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Friedman, H. S., Werner, M. H., Bigner, D. D. and Bigner, S. H., 1988, *Amplification and expression of the epidermal growth factor receptor gene in human glioma xenografts*. *Cancer Res*, 48 (8): 2231-2238.
- Hunter, K. D., Parkinson, E. K. and Harrison, P. R., 2005, *Profiling early head and neck cancer*. *Nat Rev Cancer*, 5 (2): 127-135. DOI: 10.1038/nrc1549.
- Jesse, R. H., Ballantyne, A. J. and Larson, D., 1978, *Radical or modified neck dissection: a therapeutic dilemma*. *Am J Surg*, 136 (4): 516-519.
- Ji, H., Zhao, X., Yuza, Y., Shimamura, T., Li, D., Protopopov, A., Jung, B. L., McNamara, K., Xia, H., Glatt, K. A., Thomas, R. K., Sasaki, H., Horner, J. W., Eck, M., Mitchell, A., Sun, Y., Al-Hashem, R., Bronson, R. T., Rabindran, S. K., Discafani, C. M., Maher, E., Shapiro, G. I., Meyerson, M. and Wong, K. K., 2006, *Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (20): 7817-7822. DOI: 10.1073/pnas.0510284103.
- Jouhi, L., Hagstrom, J., Atula, T. and Makitie, A., 2017, *Is p16 an adequate surrogate for human papillomavirus status determination?* *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 25 (2): 108-112. DOI: 10.1097/moo.0000000000000341.
- Jungbluth, A. A., Stockert, E., Huang, H. J., Collins, V. P., Coplan, K., Iversen, K., Kolb, D., Johns, T. J., Scott, A. M., Gullick, W. J., Ritter, G., Cohen, L., Scanlan, M. J., Cavenee, W. K. and Old, L. J., 2003, *A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the*

human epidermal growth factor receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, 100 (2): 639-644. DOI: 10.1073/pnas.232686499.

Khattri, A., Zuo, Z., Bragelmann, J., Keck, M. K., El Dinali, M., Brown, C. D., Stricker, T., Munagala, A., Cohen, E. E., Lingen, M. W., White, K. P., Vokes, E. E. and Seiwert, T. Y., 2014, *Rare occurrence of EGFRvIII deletion in head and neck squamous cell carcinoma*. Oral Oncol. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.08.014.

Klingler-Hoffmann, M., Bukczynska, P. and Tiganis, T., 2003, *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling negates the growth advantage imparted by a mutant epidermal growth factor receptor on human glioblastoma cells*. Int J Cancer, 105 (3): 331-339. DOI: 10.1002/ijc.11085.

Koch, D. T., Pickhard, A., Gebel, L., Buchberger, A. M. S., Bas, M., Mogler, C., Reiter, R., Piontek, G. and Wirth, M., 2017, *Epidermal growth factor receptor variant III in head and neck squamous cell carcinoma is not relevant for targeted therapy and irradiation*. Oncotarget, 8 (20): 32668-32682. DOI: 10.18632/oncotarget.15949.

Kuckartz, U., Rädiker, S., Ebert, T. and Schehl, J., 2010, *Statistik: Eine verständliche Einführung*. VS Verlag für Sozialwissenschaften, Wiesbaden, 1. Auflage.

Lassus, H., Sihto, H., Leminen, A., Joensuu, H., Isola, J., Nupponen, N. N. and Butzow, R., 2006, *Gene amplification, mutation, and protein expression of EGFR and mutations of ERBB2 in serous ovarian carcinoma*. J Mol Med (Berl), 84 (8): 671-681. DOI: 10.1007/s00109-006-0054-4.

Lefebvre, J. L., Chevalier, D., Luboinski, B., Kirkpatrick, A., Collette, L. and Sahnoud, T., 1996, *Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial*. EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. J Natl Cancer Inst, 88 (13): 890-899.

Lewin, F., Norell, S. E., Johansson, H., Gustavsson, P., Wennerberg, J., Biorklund, A. and Rutqvist, L. E., 1998, *Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden*. Cancer, 82 (7): 1367-1375.

Li, B., Yuan, M., Kim, I. A., Chang, C. M., Bernhard, E. J. and Shu, H. K., 2004, *Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin*. Oncogene, 23 (26): 4594-4602. DOI: 10.1038/sj.onc.1207602.

Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P. and Ferguson, K. M., 2005, *Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab*. Cancer Cell, 7 (4): 301-311. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.03.003.

Ling, D. C., Bakkenist, C. J., Ferris, R. L. and Clump, D. A., 2018, *Role of Immunotherapy in Head and Neck Cancer*. Semin Radiat Oncol, 28 (1): 12-16. DOI: 10.1016/j.semradonc.2017.08.009.

Luwor, R. B., Zhu, H. J., Walker, F., Vitali, A. A., Perera, R. M., Burgess, A. W., Scott, A. M. and Johns, T. G., 2004, *The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR*. Oncogene, 23 (36): 6095-6104. DOI: 10.1038/sj.onc.1207870.

Malkki, H., 2016, *Trial Watch: Glioblastoma vaccine therapy disappointment in Phase III trial*. Nat Rev Neurol, 12 (4): 190. DOI: 10.1038/nrneurol.2016.38.

Markovic, A. and Chung, C. H., 2012, *Current role of EGF receptor monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the management of head and neck squamous cell carcinoma*. Expert Rev Anticancer Ther, 12 (9): 1149-1159. DOI: 10.1586/era.12.91.

- Martinez-Useros, J. and Garcia-Foncillas, J., 2015, *The challenge of blocking a wider family members of EGFR against head and neck squamous cell carcinomas*. Oral Oncol, 51 (5): 423-430. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2015.02.092.
- Mast, G., 2014, *Kopf-Hals-Malignome*. Tumorzentrum München und W. Zuckerschwerdt Verlag GmbH, München, 4. Auflage.
- McIntyre, J. B., Bose, P., Klimowicz, A. C., Brockton, N. T., Petrillo, S., Matthews, W., Easaw, J., Magliocco, A. and Dort, J. C., 2012, *Specific and sensitive hydrolysis probe-based real-time PCR detection of epidermal growth factor receptor variant III in oral squamous cell carcinoma*. PLoS One, 7 (2): E31723. DOI: 10.1371/journal.pone.0031723.
- Melchers, L. J., Clausen, M. J., Mastik, M. F., Slagter-Menkema, L., Langendijk, J. A., van der Laan, B. F., van der Wal, J. E., van der Vegt, B., Roodenburg, J. L. and Schuurin, E., 2014, *Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Do Not Express EGFRvIII*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 90 (2): 454-462. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.06.035.
- Mendelsohn, J. and Baselga, J., 2003, *Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer*. J Clin Oncol, 21 (14): 2787-2799. DOI: 10.1200/jco.2003.01.504.
- Mishra, R., Hanker, A. B. and Garrett, J. T., 2017, *Genomic alterations of ERBB receptors in cancer: clinical implications*. Oncotarget, 8 (69): 114371-114392. DOI: 10.18632/oncotarget.22825.
- Mizoguchi, M., Betensky, R. A., Batchelor, T. T., Bernay, D. C., Louis, D. N. and Nutt, C. L., 2006, *Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival*. J Neuropathol Exp Neurol, 65 (12): 1181-1188. DOI: 10.1097/01.jnen.0000248549.14962.b2.
- Monticelli, M., Zeppa, P., Zenga, F., Altieri, R., Mammi, M., Bertero, L., Castellano, I., Cassoni, P., Melcarne, A., La Rocca, G., Sabatino, G., Ducati, A. and Garbossa, D., 2018, *The post-surgical era of GBM: How molecular biology has impacted on our clinical management. A review*. Clin Neurol Neurosurg, 170: 120-126. DOI: 10.1016/j.clineuro.2018.05.015.
- Mork, J., Lie, A. K., Glatte, E., Hallmans, G., Jellum, E., Koskela, P., Moller, B., Pukkala, E., Schiller, J. T., Youngman, L., Lehtinen, M. and Dillner, J., 2001, *Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 344 (15): 1125-1131. DOI: 10.1056/nejm200104123441503.
- Moscato, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L. and Wong, A. J., 1995, *Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors*. Cancer Res, 55 (23): 5536-5539.
- Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Huang, H. J., Furnari, F. B. and Cavenee, W. K., 2002, *Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas*. Cancer Res, 62 (22): 6764-6769.
- Nieto, Y., Nawaz, F., Jones, R. B., Shpall, E. J. and Nawaz, S., 2007, *Prognostic significance of overexpression and phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and the presence of truncated EGFRvIII in locoregionally advanced breast cancer*. J Clin Oncol, 25 (28): 4405-4413. DOI: 10.1200/jco.2006.09.8822.
- Ohtsuka, K., Ohnishi, H., Fujiwara, M., Kishino, T., Matsushima, S., Furuyashiki, G., Takei, H., Koshiishi, Y., Goya, T. and Watanabe, T., 2007, *Abnormalities of epidermal growth factor receptor in lung squamous-cell carcinomas, adenosquamous carcinomas, and large-cell carcinomas: tyrosine kinase domain mutations are not rare in tumors with an adenocarcinoma component*. Cancer, 109 (4): 741-750. DOI: 10.1002/cncr.22476.

- Ohtsuka, K., Ohnishi, H., Furuyashiki, G., Nogami, H., Koshiishi, Y., Ooide, A., Matsushima, S., Watanabe, T. and Goya, T., 2006, *Clinico-pathological and biological significance of tyrosine kinase domain gene mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor for lung adenocarcinoma*. *J Thorac Oncol*, 1 (8): 787-795.
- Okamoto, T. and Okabe, S., 2000, *Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution*. *Int J Mol Med*, 5 (6): 657-659.
- Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J. and Habib, F. K., 2000, *Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer*. *Br J Cancer*, 82 (1): 186-194. DOI: 10.1054/bjoc.1999.0898.
- Olshan, A. F., Weissler, M. C., Pei, H. and Conway, K., 1997, *p53 mutations in head and neck cancer: new data and evaluation of mutational spectra*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6 (7): 499-504.
- Pandita, A., Aldape, K. D., Zadeh, G., Guha, A. and James, C. D., 2004, *Contrasting in vivo and in vitro fates of glioblastoma cell subpopulations with amplified EGFR*. *Genes Chromosomes Cancer*, 39 (1): 29-36. DOI: 10.1002/gcc.10300.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P., 2005, *Global cancer statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin*, 55 (2): 74-108.
- Perez-Ordóñez, B., Beauchemin, M. and Jordan, R. C., 2006, *Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck*. *J Clin Pathol*, 59 (5): 445-453. DOI: 10.1136/jcp.2003.007641.
- Pfeifer, G. P., Denissenko, M. F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S. S. and Hainaut, P., 2002, *Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers*. *Oncogene*, 21 (48): 7435-7451. DOI: 10.1038/sj.onc.1205803.
- Pignon, J. P., le Maitre, A., Maillard, E. and Bourhis, J., 2009, *Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients*. *Radiother Oncol*, 92 (1): 4-14. DOI: 10.1016/j.radonc.2009.04.014.
- Poeta, M. L., Manola, J., Goldwasser, M. A., Forastiere, A., Benoit, N., Califano, J. A., Ridge, J. A., Goodwin, J., Kenady, D., Saunders, J., Westra, W., Sidransky, D. and Koch, W. M., 2007, *TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck*. *N Engl J Med*, 357 (25): 2552-2561. DOI: 10.1056/NEJMoa073770.
- Price, T. J., Peeters, M., Kim, T. W., Li, J., Cascinu, S., Ruff, P., Suresh, A. S., Thomas, A., Tjulandin, S., Zhang, K., Murugappan, S. and Sidhu, R., 2014, *Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study*. *Lancet Oncol*, 15 (6): 569-579. DOI: 10.1016/s1470-2045(14)70118-4.
- Rae, J. M., Scheys, J. O., Clark, K. M., Chadwick, R. B., Kiefer, M. C. and Lippman, M. E., 2004, *EGFR and EGFRvIII expression in primary breast cancer and cell lines*. *Breast Cancer Res Treat*, 87 (1): 87-95. DOI: 10.1023/B:BREA.0000041585.26734.f9.
- Reardon, D. A., Lassman, A. B., van den Bent, M., Kumthekar, P., Merrell, R., Scott, A. M., Fichtel, L., Sulman, E. P., Gomez, E., Fischer, J., Lee, H. J., Munasinghe, W., Xiong, H., Mandich, H., Roberts-Rapp, L., Ansell, P., Holen, K. D. and Gan, H. K., 2017, *Efficacy and safety results of ABT-414 in combination with radiation and temozolomide in newly diagnosed glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 19 (7): 965-975. DOI: 10.1093/neuonc/now257.
- Reilly, E. B., Phillips, A. C., Buchanan, F. G., Kingsbury, G., Zhang, Y., Meulbroek, J. A., Cole, T. B., DeVries, P. J., Falls, H. D., Beam, C., Gu, J., Digiammarino, E. L., Palma, J. P., Donawho, C. K.,

- Goodwin, N. C. and Scott, A. M., 2015, *Characterization of ABT-806, a Humanized Tumor-Specific Anti-EGFR Monoclonal Antibody*. *Mol Cancer Ther*, 14 (5): 1141-1151. DOI: 10.1158/1535-7163.Mct-14-0820.
- Reiter, J. L. and Maihle, N. J., 1996, *A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor*. *Nucleic Acids Res*, 24 (20): 4050-4056.
- Richard, J. M., Sancho-Garnier, H., Pessey, J. J., Luboinski, B., Lefebvre, J. L., Dehesdin, D., Stromboni-Luboinski, M. and Hill, C., 1998, *Randomized trial of induction chemotherapy in larynx carcinoma*. *Oral Oncol*, 34 (3): 224-228.
- Rischin, D., Spigel, D. R., Adkins, D., Wein, R., Arnold, S., Singhal, N., Lee, O. and Murugappan, S., 2016, *PRISM: Phase 2 trial with panitumumab monotherapy as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Head Neck*, 38 Suppl 1: E1756-1761. DOI: 10.1002/hed.24311.
- Rodrigo, J. P., Grilli, G., Shah, J. P., Medina, J. E., Robbins, K. T., Takes, R. P., Hamoir, M., Kowalski, L. P., Suarez, C., Lopez, F., Quer, M., Boedeker, C. C., de Bree, R., Coskun, H., Rinaldo, A., Silver, C. E. and Ferlito, A., 2018, *Selective neck dissection in surgically treated head and neck squamous cell carcinoma patients with a clinically positive neck: Systematic review*. *Eur J Surg Oncol*, 44 (4): 395-403. DOI: 10.1016/j.ejso.2018.01.003.
- Saikali, S., Avril, T., Collet, B., Hamlat, A., Bansard, J. Y., Drenou, B., Guegan, Y. and Quillien, V., 2007, *Expression of nine tumour antigens in a series of human glioblastoma multiforme: interest of EGFRvIII, IL-13Ralpha2, gp100 and TRP-2 for immunotherapy*. *J Neurooncol*, 81 (2): 139-148. DOI: 10.1007/s11060-006-9220-3.
- Sampson, J. H., Heimberger, A. B., Archer, G. E., Aldape, K. D., Friedman, A. H., Friedman, H. S., Gilbert, M. R., Herndon, J. E., 2nd, McLendon, R. E., Mitchell, D. A., Reardon, D. A., Sawaya, R., Schmittling, R. J., Shi, W., Vredenburgh, J. J. and Bigner, D. D., 2010, *Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma*. *J Clin Oncol*, 28 (31): 4722-4729. DOI: 10.1200/jco.2010.28.6963.
- Sasaki, H., Kawano, O., Endo, K., Yukiue, H., Yano, M. and Fujii, Y., 2007, *EGFRvIII mutation in lung cancer correlates with increased EGFR copy number*. *Oncol Rep*, 17 (2): 319-323.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. and Howley, P. M., 1990, *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. *Cell*, 63 (6): 1129-1136.
- Shah, J. P., Candela, F. C. and Poddar, A. K., 1990, *The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity*. *Cancer*, 66 (1): 109-113.
- Sharafinski, M. E., Ferris, R. L., Ferrone, S. and Grandis, J. R., 2010, *Epidermal growth factor receptor targeted therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Head Neck*, 32 (10): 1412-1421. DOI: 10.1002/hed.21365.
- Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J., Oka, K., Ishimaru, Y. and Ushio, Y., 2003, *Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme*. *Cancer Res*, 63 (20): 6962-6970.
- Slaughter, D. P., Southwick, H. W. and Smejkal, W., 1953, *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin*. *Cancer*, 6 (5): 963-968.
- Smilek, P., Neuwirthova, J., Jarkovsky, J., Dusek, L., Rottenberg, J., Kostrica, R., Srovnal, J., Hajduch, M., Drabek, J. and Klozar, J., 2012, *Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression*

and mutations in the EGFR signaling pathway in correlation with anti-EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Neoplasma*, 59 (5): 508-515. DOI: 10.4149/neo_2012_065.

Sok, J. C., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. L., Freilino, M. L., Graner, M. W., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., Gooding, W. E., Furnari, F. B. and Grandis, J. R., 2006, *Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting*. *Clin Cancer Res*, 12 (17): 5064-5073. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-06-0913.

Sonnweber, B., Dlaska, M., Skvortsov, S., Dirnhofer, S., Schmid, T. and Hilbe, W., 2006, *High predictive value of epidermal growth factor receptor phosphorylation but not of EGFRvIII mutation in resected stage I non-small cell lung cancer (NSCLC)*. *J Clin Pathol*, 59 (3): 255-259. DOI: 10.1136/jcp.2005.027615.

Spindler, K. L., Olsen, D. A., Nielsen, J. N., Brandslund, I., Poulsen, H. S., Villingshoj, M. and Jakobsen, A., 2006, *Lack of the type III epidermal growth factor receptor mutation in colorectal cancer*. *Anticancer Res*, 26 (6c): 4889-4893.

Steffensen, K. D., Waldstrom, M., Olsen, D. A., Corydon, T., Lorentzen, K. A., Knudsen, H. J., Jeppesen, U., Brandslund, I. and Jakobsen, A., 2008, *Mutant epidermal growth factor receptor in benign, borderline, and malignant ovarian tumors*. *Clin Cancer Res*, 14 (11): 3278-3282. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-07-4171.

Steinau, M., Saraiya, M., Goodman, M. T., Peters, E. S., Watson, M., Cleveland, J. L., Lynch, C. F., Wilkinson, E. J., Hernandez, B. Y., Copeland, G., Saber, M. S., Hopenhayn, C., Huang, Y., Cozen, W., Lyu, C. and Unger, E. R., 2014, *Human papillomavirus prevalence in oropharyngeal cancer before vaccine introduction, United States*. *Emerg Infect Dis*, 20 (5): 822-828. DOI: 10.3201/eid2005.131311.

Stewart, G. D., Baird, J., Rae, F., Nanda, J., Riddick, A. C. and Harrison, D. J., 2011, *Utilizing mRNA extracted from small, archival formalin-fixed paraffin-embedded prostate samples for translational research: assessment of the effect of increasing sample age and storage temperature*. *Int Urol Nephrol*, 43 (4): 961-967. DOI: 10.1007/s11255-011-9948-3.

Stintzing, S., 2014, *Management of colorectal cancer*. *F1000Prime Rep*, 6 (108). DOI: 10.12703/p6-108.

Tanaka, K., Babic, I., Nathanson, D., Akhavan, D., Guo, D., Gini, B., Dang, J., Zhu, S., Yang, H., De Jesus, J., Amzajerdi, A. N., Zhang, Y., Dibble, C. C., Dan, H., Rinkenbaugh, A., Yong, W. H., Vinters, H. V., Gera, J. F., Cavenee, W. K., Cloughesy, T. F., Manning, B. D., Baldwin, A. S. and Mischel, P. S., 2011, *Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF-kappaB pathway that promotes chemotherapy resistance*. *Cancer Discov*, 1 (6): 524-538. DOI: 10.1158/2159-8290.Cd-11-0124.

Thorne, A. H., Zanca, C. and Furnari, F., 2016, *Epidermal growth factor receptor targeting and challenges in glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 18 (7): 914-918. DOI: 10.1093/neuonc/nov319.

Tidow, N., Boecker, A., Schmidt, H., Agelopoulos, K., Boecker, W., Buerger, H. and Brandt, B., 2003, *Distinct amplification of an untranslated regulatory sequence in the egfr gene contributes to early steps in breast cancer development*. *Cancer Res*, 63 (6): 1172-1178.

Tinhofer, I., Klinghammer, K., Weichert, W., Knodler, M., Stenzinger, A., Gauler, T., Budach, V. and Keilholz, U., 2011, *Expression of amphiregulin and EGFRvIII affect outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment*. *Clin Cancer Res*, 17 (15): 5197-5204. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-10-3338.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. and Jemal, A., 2015, *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 65 (2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.

Tsuchida, N., Murugan, A. K. and Grieco, M., 2016, *Kirsten Ras* oncogene: Significance of its discovery in human cancer research*. Oncotarget, 7 (29): 46717-46733. DOI: 10.18632/oncotarget.8773.

Tupchong, L., Scott, C. B., Blitzer, P. H., Marcial, V. A., Lowry, L. D., Jacobs, J. R., Stetz, J., Davis, L. W., Snow, J. B., Chandler, R. and et al., 1991, *Randomized study of preoperative versus postoperative radiation therapy in advanced head and neck carcinoma: long-term follow-up of RTOG study 73-03*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 20 (1): 21-28.

van den Bent, M., Gan, H. K., Lassman, A. B., Kumthekar, P., Merrell, R., Butowski, N., Lwin, Z., Mikkelsen, T., Nabors, L. B., Papadopoulos, K. P., Penas-Prado, M., Simes, J., Wheeler, H., Walbert, T., Scott, A. M., Gomez, E., Lee, H. J., Roberts-Rapp, L., Xiong, H., Bain, E., Ansell, P. J., Holen, K. D., Maag, D. and Reardon, D. A., 2017, *Efficacy of depatuxizumab mafodotin (ABT-414) monotherapy in patients with EGFR-amplified, recurrent glioblastoma: results from a multi-center, international study*. Cancer Chemother Pharmacol, 80 (6): 1209-1217. DOI: 10.1007/s00280-017-3451-1.

Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kaweckki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H. R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N. and Hitt, R., 2008, *Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer*. N Engl J Med, 359 (11): 1116-1127. DOI: 10.1056/NEJMoa0802656.

Vermorken, J. B., Stohlmacher-Williams, J., Davidenko, I., Licitra, L., Winkvist, E., Villanueva, C., Foa, P., Rottey, S., Skladowski, K., Tahara, M., Pai, V. R., Faivre, S., Blajman, C. R., Forastiere, A. A., Stein, B. N., Oliner, K. S., Pan, Z. and Bach, B. A., 2013, *Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial*. Lancet Oncol, 14 (8): 697-710. DOI: 10.1016/s1470-2045(13)70181-5.

Vermorken, J. B., Trigo, J., Hitt, R., Koralewski, P., Diaz-Rubio, E., Rolland, F., Knecht, R., Amellal, N., Schueler, A. and Baselga, J., 2007, *Open-label, uncontrolled, multicenter phase II study to evaluate the efficacy and toxicity of cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy*. J Clin Oncol, 25 (16): 2171-2177. DOI: 10.1200/jco.2006.06.7447.

Viana-Pereira, M., Lopes, J. M., Little, S., Milanezi, F., Basto, D., Pardal, F., Jones, C. and Reis, R. M., 2008, *Analysis of EGFR overexpression, EGFR gene amplification and the EGFRvIII mutation in Portuguese high-grade gliomas*. Anticancer Res, 28 (2a): 913-920.

Vigneswaran, N. and Williams, M. D., 2014, *Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis*. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 26 (2): 123-141. DOI: 10.1016/j.coms.2014.01.001.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. and Bos, J. L., 1988, *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 319 (9): 525-532. DOI: 10.1056/nejm198809013190901.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr. and Kinzler, K. W., 2013, *Cancer genome landscapes*. Science, 339 (6127): 1546-1558. DOI: 10.1126/science.1235122.

Waring, P., Tie, J., Maru, D. and Karapetis, C. S., 2016, *RAS Mutations as Predictive Biomarkers in Clinical Management of Metastatic Colorectal Cancer*. Clin Colorectal Cancer, 15 (2): 95-103. DOI: 10.1016/j.clcc.2015.10.006.

- Weiss, M. H., Harrison, L. B. and Isaacs, R. S., 1994, *Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N0 neck*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 120 (7): 699-702.
- Weller, M., Kaulich, K., Hentschel, B., Felsberg, J., Gramatzki, D., Pietsch, T., Simon, M., Westphal, M., Schackert, G., Tonn, J. C., von Deimling, A., Davis, T., Weiss, W. A., Loeffler, M. and Reifenberger, G., 2014, *Assessment and prognostic significance of the epidermal growth factor receptor vIII mutation in glioblastoma patients treated with concurrent and adjuvant temozolomide radiochemotherapy*. Int J Cancer, 134 (10): 2437-2447. DOI: 10.1002/ijc.28576.
- Wheeler, S., Siwak, D. R., Chai, R., LaValle, C., Seethala, R. R., Wang, L., Cieply, K., Sherer, C., Joy, C., Mills, G. B., Argiris, A., Siegfried, J. M., Grandis, J. R. and Egloff, A. M., 2012, *Tumor epidermal growth factor receptor and EGFR PY1068 are independent prognostic indicators for head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 18 (8): 2278-2289. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-11-1593.
- Wheeler, S. E., Egloff, A. M., Wang, L., James, C. D., Hammerman, P. S. and Grandis, J. R., 2015, *Challenges in EGFRvIII detection in head and neck squamous cell carcinoma*. PLoS One, 10 (2): E0117781. DOI: 10.1371/journal.pone.0117781.
- Wheeler, S. E., Morariu, E. M., Bednash, J. S., Otte, C. G., Seethala, R. R., Chiosea, S. I. and Grandis, J. R., 2012, *Lyn kinase mediates cell motility and tumor growth in EGFRvIII-expressing head and neck cancer*. Clin Cancer Res, 18 (10): 2850-2860. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-11-2486.
- Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., Traweck, S. T., Wong, A. J., Zalutsky, M. R. and Bigner, D. D., 1995, *Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas*. Cancer Res, 55 (14): 3140-3148.
- Wittekind, C., 2016, *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. Wiley-VCN Verlag, Weinheim, 8. Auflage.
- Wittekind, C. and Meyer, H.-J., 2010, *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. Wiley-VCN Verlag, Weinheim, 7. Auflage.
- Witusik-Perkowska, M., Rieske, P., Hulas-Bigoszewska, K., Zakrzewska, M., Stawski, R., Kulczycka-Wojdala, D., Bienkowski, M., Stoczynska-Fidelus, E., Gresner, S. M., Piaskowski, S., Jaskolski, D. J., Papierz, W., Zakrzewski, K., Kolasa, M., Ironside, J. W. and Liberski, P. P., 2011, *Glioblastoma-derived spheroid cultures as an experimental model for analysis of EGFR anomalies*. J Neurooncol, 102 (3): 395-407. DOI: 10.1007/s11060-010-0352-0.
- Wolf, G. T., Fisher, S. G., Hong, W. K., Hillman, R., Spaulding, M., Laramore, G. E., Endicott, J. W., McClatchey, K. and Henderson, W. G., 1991, *Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer*. N Engl J Med, 324 (24): 1685-1690. DOI: 10.1056/nejm199106133242402.
- Yang, B., Chen, J., Zhang, X. and Cao, J., 2009, *Expression of Epidermal Growth Factor Receptor variant III in laryngeal carcinoma tissues*. Auris Nasus Larynx, 36 (6): 682-687. DOI: 10.1016/j.anl.2009.03.002.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X., 2001, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2 (2): 127-137. DOI: 10.1038/35052073.
- Yoshimoto, K., Dang, J., Zhu, S., Nathanson, D., Huang, T., Dumont, R., Seligson, D. B., Yong, W. H., Xiong, Z., Rao, N., Winther, H., Chakravarti, A., Bigner, D. D., Mellinghoff, I. K., Horvath, S., Cavenee, W. K., Cloughesy, T. F. and Mischel, P. S., 2008, *Development of a real-time RT-PCR assay for detecting EGFRvIII in glioblastoma samples*. Clin Cancer Res, 14 (2): 488-493. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-07-1966.

Yu, H., Gong, X., Luo, X., Han, W., Hong, G., Singh, B. and Tang, C. K., 2008, *Co-expression of EGFRvIII with ErbB-2 enhances tumorigenesis: EGFRvIII mediated constitutively activated and sustained signaling pathways, whereas EGF-induced a transient effect on EGFR-mediated signaling pathways*. *Cancer Biol Ther*, 7 (11): 1818-1828.

Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A. and Kuriyan, J., 2006, *An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor*. *Cell*, 125 (6): 1137-1149. DOI: 10.1016/j.cell.2006.05.013.

Zhang, Z., Stiegler, A. L., Boggon, T. J., Kobayashi, S. and Halmos, B., 2010, *EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology*. *Oncotarget*, 1 (7): 497-514. DOI: 10.18632/oncotarget.186.

13 Danksagung

Ganz besonders und an erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Anja Pickhard für die beispiellose Unterstützung bei meiner Arbeit im Labor und bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Trotz enormer Arbeitsbelastung in Klinik und Forschung war sie stets für alle Fragen und Belange die entscheidende Ansprechpartnerin.

Umfangreiche Unterstützung erhielt ich dankenswerterweise ebenfalls von meinem Mentor Herrn Dr. med. Markus Wirth. Seinen Aufgaben als Mentor wurde er mehr als gerecht und war mir bei allen Fragestellungen stets eine große Hilfe.

Bei Herrn Guido Piontek möchte ich mich im Speziellen für die Unterstützung bei allen experimentellen Methoden bedanken. Als Laborleiter war er stets erster Ansprechpartner für komplexe methodische Fragen. Eine experimentelle Arbeit dieses Umfangs wäre ohne seine kompetente Unterstützung schwer möglich gewesen.

Auch Herr Peter Strzelczyk unterstützte mich bei der praktischen Arbeit im Labor.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Univ. Prof. Dr. med. Henning Bier, dessen onkologisches Labor mir die experimentelle Arbeit erst ermöglichte. Sein trauriges Schicksal hat uns alle sehr betroffen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, ohne die mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.