

Untersuchung von Rezidiv-Plattenepithelkarzinomen bei Kopf- und Halstumoren im Bereich der Feldgrenzen nach primärer Radiochemotherapie

Andreas Schaffelhofer, B.Sc.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Markus Wirth
2. Priv.-Doz. Dr. Jan Peeken

Die Dissertation wurde am 17.10.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.04.2023 angenommen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde. Ich habe alle direkten und indirekten Zitate deutlich gekennzeichnet und die Quellen im Literaturverzeichnis korrekt angegeben.

Andreas Schaffelhofer

Gender-Definition

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Doktorarbeit die Sprachform des generischen Maskulinums angewendet. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die ausschließliche Verwendung der männlichen Form geschlechtsunabhängig verstanden werden muss.

Für meine Eltern, meine Schwester und meine Großeltern

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis	7
2	Einleitung	12
2.1	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches	12
2.1.1	Epidemiologie der Kopf- und Halstumore	12
2.1.2	Klassifikation der Kopf- und Halstumore	13
2.1.3	Risikofaktoren, Ätiologie und klinisches Bild	16
2.1.4	Diagnostik	17
2.1.5	Therapie	18
2.1.6	Molekularpathologie des Plattenepithelkarzinoms	20
2.2	Prozesse der Krebsentstehung	22
2.3	Biomarker	25
2.3.1	Signaltransduktionsmoleküle	25
2.3.2	Krebsstammzellenmarker	31
2.3.3	Rolle des Immunsystems in der Krebsentstehung	35
2.3.4	Humanes Papilloma Virus	39
2.4	Problemstellung	42
2.5	Zielsetzung dieser Arbeit	42
3	Material und Methoden	44
3.1	Material	44
3.1.1	Primärantikörper	44
3.1.2	Chemikalien	45
3.1.3	Geräte	46
3.1.4	Verbrauchsmaterialien	46
3.1.5	Softwareprogramme	46
3.2	Methoden	47
3.2.1	Studienkollektiv	47
3.2.2	Kollektiv zur Immunhistochemischen Analyse	49
3.2.3	Immunhistochemie	49
3.2.4	Zellmigrationsanalyse	51
3.2.5	Statistik	53
4	Ergebnisse	55
4.1	Charakterisierung des Kollektivs	55

4.2	Immunhistochemische Auswertung	58
4.2.1	Immunhistochemische Abbildungen der einzelnen Marker.....	58
4.3	Statistische Auswertung	61
4.3.1	Korrelationsanalyse.....	61
4.3.2	Vier-Felder-Tafeln	63
4.3.3	Überlebenskurven – Kaplan-Meier-Analysen	69
4.3.4	Cox-Regressions-Model.....	77
4.3.5	Untersuchung der Feldrand-Rezidive	80
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	85
5	Diskussion	86
5.1	Problemstellung.....	86
5.2	Erwartungen an unsere Ergebnisse.....	87
5.3	Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Wissenschaft.....	88
5.3.1	Signaltransduktions-Marker (pAkt, Survivin, Hif1 α).....	88
5.3.2	Krebsstammzellmarker (CD44, ALDH1).....	92
5.3.3	Immunzellmarker (PD-1, PD-L1).....	94
5.3.4	Humanes Papilloma Virus (P16).....	96
5.3.5	Untersuchung der Feldrand-Rezidive	98
5.3.6	Probleme	102
6	Zusammenfassung.....	104
7	Abbildungsverzeichnis	106
8	Tabellenverzeichnis.....	108
9	Literaturverzeichnis.....	110
10	Anhang.....	126
11	Veröffentlichungen.....	132
12	Danksagung.....	133

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
5-JÜR	5-Jahres-Überlebens-Rate
a	Autopsie
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALDH1	Aldehyddehydrogenase 1
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Bad	BCL2 Associated Agonist of Cell Death
BCL2	B-Cell Lymphoma 2
BIRC5	Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Repeat-Containing 5
BRCA2	Breast Cancer Gene 2
BRD	Bundesrepublik Deutschland
Bspw.	Beispielsweise
Bzw.	Beziehungsweise
c	Clinical
CD44	Cluster of Differentiation 44
CI	Confidence Interval
CIC	Cancer Immunity Cycle
CH	Schweiz
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein 4
CSC	Cancer Stem Cells
CUP	Cancer of Unknown Primary
CycD1	Cyclin D1
DAB	Diaminobenzin
DE	Deutschland
DFS	Disease Free Survival

Abkürzung	Erklärung
EGFR	Epidermal Growth Factor
ED	Ektodomäne
EMT	Epithelial-Mesenchymal-Transition
EORTC QLQ-H&N35	European Organization for Research and Treatment of Cancer - Quality of Life Questionnaire Head and Neck Module
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin Embedded
FISH	Fluorescence in situ Hybridization
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
FISH	Fluorescence in situ Hybridization
FOXO3a	Forehead-Box-Protein 03a
CT	Computer-Tomographie
G	Grading
GLUT4	Glucose-Transporter 4
GmbH & Co.KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β
Gy	Gray
H2AX	Histon 2 AX
HBXIP	Hepatitis B X-interacting Protein
HIF1 α	Hypoxia Induced Factor 1 α
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Human Papilloma Virus
HR	Hazard Ratio
IAP	Inhibitor of Apoptosis

Abkürzung	Erklärung
ICD	Intrazelluläre Domäne
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
UICC	International Union for Cancer Control
IRS	Immunreaktiver Score
JAK-STAT	Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription
kDa	Kilo Dalton
LARG	Leukemia-associated Rho-Guanine
LOH	Loss of Heterozygosity
LRP6	Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein 6
M	Fernmetastase
MAPK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase
MDM2	Maus-Doppel-Minute-2-Homolog
MeV	Megaelektronenvolt
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
N	Node (Lymphknotenmetastase)
NCI	National Cancer Institute
ND	Neck Dissection
OP	Operation
OPSCC	Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma
OS	Overall Survival (Gesamtüberleben)
p	Pathologisch
p16	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A
P27	Protein 27
P53	Retinoblastoma

Abkürzung	Erklärung
P53BP1	p53-binding Protein 1
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand Protein 1
PDE3B	Phospho-Diesterase 3B
PE	Probenentnahme
PE-CA	Plattenepithelkarzinom
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PET-CT	Positronenemissionstomografie- Computertomographie
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PTV	Planned Target Volume
PP	Percentage Points
PP2A	Proteinphosphatase 2
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PI3K-AKT-mToR	Phosphatidylinositol-3-Kinase-AKT-Mammalian Target of Rapamycin
QoL	Quality of Life
r	Rezidiv
R	Residualfaktor
RA	Retinoic Acid
Rb	Retinoblastoma
RCTx	Primäre Radiochemotherapie
RKI	Robert-Koch-Institut
RTK	Rezeptortyrosinkinase

Abkürzung	Erklärung
SI	Staining Intensity
Smac/Diablo	Second Mitochondria derived Activator of Caspases/direct IAP binding protein with low PI
SMG1	Serine/Threonine-Protein Kinase
S.o.	Siehe oben
T	Tumorgröße
TD	Transmembrandomäne
TIL	Tumor-infiltrating Lymphocytes
TNM	Tumor-Nodus-Metastase
TRIS	Tris-Aminomethan
TUM	Technische Universität München
USA	United States of America
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
y	Neoadjuvante Radio-/Chemotherapie
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

2 Einleitung

2.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinome werden in der englischsprachigen Literatur mit HNSCC (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) abgekürzt. Diese sind laut Definition Tumore, welche im paranasalen Sinus, der Nasenhöhle, der Mundhöhle, dem Pharynx oder dem Larynx auftreten. Sie können die Struktur und Funktion von Organen beeinflussen, die für Stimm-, Sprach-, Geruchs- und Geschmacksbildung zuständig sind. Darüber hinaus können auch das Gehör oder lebensnotwendige Funktionen, wie Atmung und Nahrungsaufnahme, beeinflusst werden (Thomas, Nadiminti et al. 2005). All diese Tumor-Lokalisationen ähneln sich hinsichtlich ihrer Epidemiologie, Behandlung und Prognose. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind dies maligne, epitheliale Tumore mit plattenepithelialer Differenzierung, charakterisiert durch ein vom histologischen Malignitätsgrad abhängiges Ausmaß an Hornbildung und Vorhandensein von Interzellularbrücken (Mast 2014). Davon abzugrenzen sind weniger häufig vorkommende Tumorentitäten, welche sich vor allem durch die Histologie, aber auch hinsichtlich klinischer Präsentation, deutlich unterscheiden. Hierzu zählen etwa das verruköse Karzinom (früher Ackermann-Tumor), das basaloide Plattenepithelkarzinom, das spindelzellige Karzinom und das lymphoepitheliale Karzinom (Böcker 2008). Etwa 40 - 70% aller Tonsillen- und Zungengrundkarzinome sind mit dem Humanen Papilloma Virus (HPV) assoziiert. Diese Karzinome werden ebenfalls als eigene Entität gezählt, da sie sich hinsichtlich ihrer Prognose deutlich von anderen Entitäten unterscheiden (Mast 2014).

2.1.1 Epidemiologie der Kopf- und Halstumore

HNSCCs sind für etwa 6% aller Krebserkrankungen verantwortlich. Sie stellen somit nach den Malignomen von Prostata, Darm, Lunge, Harnblase und dem malignen Melanom die sechsthäufigste Tumorentität weltweit dar. In absoluten Zahlen ausgedrückt bedeutet dies etwa 650.000 Neuerkrankungen, sowie 350.000 Krebstote pro Jahr weltweit (Argiris, Karamouzis et al. 2008). Allein in Europa treten jedes Jahr etwa 139.000 HNSCC-Neuerkrankungen auf (Gregoire, Lefebvre et al. 2010). Laut den neuesten Daten des Robert-Koch-Institutes (RKI) befinden sich HNSCCs bei Männern an neunter Stelle sowie bei Frauen an fünfzehnter Stelle aller Krebsneuerkrankungen. Bezogen auf die Bundesrepublik Deutschland (BRD) bedeutet dies konkret 9720 erkrankte Männer und 4180 Frauen für das Jahr 2016, bei einer Mortalität von 4070 bei Männern sowie 1387 bei Frauen (Koch-Institut and e.V. 2019). Bei Frauen spielen diese Karzinome eine eher untergeordnete Rolle. Einer der Hauptgründe dafür ist der geschlechtsspezifische Unterschied im Konsum der klassischen Risikofaktoren Alkohol und Tabak (Koch-Institut and e.V. 2019). Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 61 und für Frauen bei 65 Jahren. Bei Männern treten zumeist Karzinome

der Mundhöhle oder des Larynx auf, während bei Frauen Oropharynxkarzinome überwiegen (Vigneswaran and Williams 2014). Hinsichtlich der altersstandardisierten Mortalität konnte bei Männern in den letzten Jahren ein leichter Rückgang (6,7/100.000) beobachtet werden, während sie bei Frauen annähernd konstant blieb (1,8/100.000) (Koch-Institut and e.V. 2019). Etwa zwei Drittel aller HNSCCs werden erst in fortgeschrittenen Tumorstadien entdeckt, in denen oftmals bereits eine lymphogene Metastasierung erfolgt ist (Argiris, Karamouzis et al. 2008). Neben einem erhöhten Risiko für Zweiterkrankungen ist dieses Faktum ein Grund für eine durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von lediglich 47 – 63% je nach Entität und Geschlecht. Männer haben eine geringere 5-JÜR als Frauen (Argiris, Brockstein et al. 2004, Koch-Institut and e.V. 2019).

2.1.2 Klassifikation der Kopf- und Halstumore

HNSCCs werden wie andere Tumore nach der TNM-Klassifikation, der International Union for Cancer Control (UICC), eingeteilt. Die TNM-Klassifikation ermöglicht eine internationale Vergleichbarkeit, das Erstellen von Statistiken, sowie eine gemeinsame Therapieplanung der beteiligten Disziplinen. In den Tabellen 1 bis 3 werden die einzelnen Punkte dieser Einteilung genauer erläutert. „T“ steht grundsätzlich für Primärtumorausdehnung, „N“ für Lymphknotenmetastase und „M“ für Fernmetastase. Die T- und N-Einteilungen variieren je nach Lokalisation des Primärtumors. Im Gegensatz dazu gilt die M-Einteilung gleichermaßen für alle Kopf-Hals-Tumore (Webber, Gospodarowicz et al. 2014). Der Zusatz p (pathologisch) bedeutet, dass die Klassifizierung anhand der Befunde der histopathologischen Untersuchung des Operationspräparates getroffen wurde (Wittekind 2010).

pT-Klassifikation	
pTx	Primärtumor kann histologisch nicht gedeutet werden
pT0	Kein histologischer Anhalt für einen Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1-T4	Zunehmende Größe und/oder lokale Ausdehnung des Primärtumors

Tabelle 1: Primär-Tumor (T) der Mundhöhle (Wittekind 2010)

pN-Klassifikation	
pNx	Regionäre Lymphknoten können histologisch nicht beurteilt werden
pT0	Kein histologischer Anhalt für Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten ≤ 3 cm
pN2a	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten > 3 cm aber < 6 cm
pN2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten ≤ 6 cm
pN2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten alle ≤ 6 cm
pN3	Metastase(n) in Lymphknoten > 6 cm

Tabelle 2: Lymphknotenmetastasen (N) außer Tumore des Nasopharynx (Wittekind 2010)

pM-Klassifikation	
pMx	Fernmetastase(n) können histologisch nicht beurteilt werden
pM0	Kein histologischer Anhalt für Fernmetastase(n)
pM1	Histologisch gesicherte Fernmetastase(n)

Tabelle 3: Fernmetastasen (M) mit Primärtumor im Kopf-Hals-Bereich (Wittekind 2010)

Die TNM-Klassifikation im engeren Sinn gibt keinerlei Hinweise über die durchzuführende Therapie. Es fehlt ein etablierter Klassifikationsmarker, welcher Rückschlüsse auf den Therapieerfolg zulässt. Aus diesem Grund wird zusätzlich der Residualfaktor (R) ermittelt. Dieser darf allerdings nur in Bezug auf den Primärtumor angewendet werden. Das zusätzliche Vorhandensein eines Residualtumors kann ein entscheidender Faktor für die weiterführende Therapieplanung sein (Wittekind 2010).

Residualtumor R	
Rx	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Tabelle 4: Residualtumor (R) mit Primärtumor im Kopf-Hals-Bereich (Wittekind 2010)

In der TNM-Klassifikation wird ebenfalls die histomorphologische Malignitätsgraduierung (G) erfasst. Diese gilt für alle Lokalisationen von HNSCCs. Sie gibt Auskunft über die Differenzierung und folglich auch den Malignitätsgrad des Tumors (Wittekind 2010).

Grading G	
Gx	Grad der Differenzierung kann nicht bestimmt werden
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

Tabelle 5: Histopathologisches Grading (G) (Wittekind 2010)

Zusätzlich zu den bisherigen Unterteilungen findet man auch Zusatz-Symbole, die als Kleinbuchstaben vor dem jeweiligen Faktor angegeben werden. So bedeutet ein „c“, dass das Staging durch eine klinische (englisch: clinical) Untersuchung, also prätherapeutisch erfolgte. Bei vorangestelltem „a“ wurde der Tumor im Rahmen einer Autopsie klassifiziert. Bei klinisch besonders ausgedehnten Tumoren kann es oft notwendig sein, vor der eigentlichen chirurgischen Entfernung eine neoadjuvante Chemotherapie durchführen zu müssen. Um diese Art der Vorbehandlung in der TNM-Klassifikation hervorzuheben, wird in diesem Fall ein „y“ vorangestellt. Tritt ein Rezidiv nach zunächst erfolgreicher Therapie auf, so wird dies mit einem „r“ gekennzeichnet. So kommt es zu keiner Verwechslung mit der primären Klassifikation (Wittekind 2010). Ausgehend von der TNM-Klassifikation teilt die UICC die HNSCCs in nachfolgende Stadien ein:

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N0, N1	M0
	T3	N1	
IV A	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	
IV B	alle T	N3	M0
	T4b	alle N	
IV C	alle T	alle N	M1

Tabelle 6: Stadieneinteilung der HNSCCs (Wittekind 2010)

2.1.3 Risikofaktoren, Ätiologie und klinisches Bild

Die genauen Ursachen für die Entstehung von HNSCCs sind nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Als gesichert gilt bisher, dass Alkohol- und Tabakkonsum die beiden wichtigsten Risikofaktoren darstellen (Blot, McLaughlin et al. 1988). So erhöht übermäßiger Alkohol- oder Tabakkonsum allein bereits das Risiko ein HNSCC zu entwickeln (Hashibe, Brennan et al. 2007). Beide in Kombination zeigen einen deutlich synergistischen Effekt (Pelucchi, Gallus et al. 2008). Menschen, die regelmäßig Alkohol zusammen mit Tabak konsumieren, haben ein bis zu 35-fach erhöhtes Risiko, an einem HNSCC zu erkranken, als Menschen ohne diese Noxen-Exposition (Blot, McLaughlin et al. 1988). Raucher haben zudem ein bis zu zehnfach erhöhtes Risiko an einem HNSCC zu erkranken (Schlecht, Franco et al. 1999). Trotz weltweit erkennbarem Trend im Rückgang der Raucherzahlen, sind nach wie vor zirka 80% aller HNSCCs mit Tabakkonsum assoziiert (Sturgis and Cinciripini 2007).

Gleichzeitig beobachtet man seit einigen Jahren eine Zunahme der nicht noxenassoziierten Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas (OPSCC), einer Subgruppe der HNSCCs (Chaturvedi, Engels et al. 2011). Diese sind zumeist HPV-assoziiert und treten gehäuft bei männlichen Erwachsenen mittleren Alters, Nichtrauchern sowie Immunsupprimierten auf (Argiris, Karamouzis et al. 2008, Marur, D'Souza et al. 2010). Es gibt etwa 100 verschiedene Subtypen von HPV, von denen vor allem HPV 16 und in geringerem Ausmaß HPV 18 kanzerogene Eigenschaften besitzen (D'Souza, Kreimer et al. 2007). Einerseits wird bei HPV-assoziierten HNSCCs meist ein fortgeschrittenes Tumorstadium und Lymphknotenmetastasen bei der Primärdiagnose nachgewiesen (Lindenblatt Rde, Martinez et al. 2012), andererseits wird für HPV-assoziierte OPSCCs in der Literatur auch erhöhte Radiosensitivität beschrieben (Gottgens, Ostheimer et al. 2018, Liu, Mann et al. 2018). Es gilt heute als erwiesen, dass die HPV-assoziierte Kanzerogenese der HNSCCs einer anderen Molekularpathologie folgt als die der nicht HPV-assoziierten Karzinome. Ging man vor 10 Jahren noch von einem Anteil von 20% der HPV-assoziierten Tumore an allen HNSCCs aus (Leemans, Braakhuis et al. 2011), so gehen neueste Schätzungen von einer Prävalenz von 30 bis annähernd 60% HPV-assoziiertes Tumore an allen HNSCCs aus. Besonders in den westlichen Ländern ist eine deutliche Zunahme im vergangenen Jahrzehnt zu beobachten (Economopoulou, Kotsantis et al. 2020). Die HPV-Infektion als Risikofaktor wird im Kapitel p16 noch genauer betrachtet. Dort wird auch die Bedeutung der Onkoproteine E6 und E7 näher erläutert.

Neben diesen drei Hauptrisikofaktoren werden zudem zahlreiche andere Noxen für die Entstehung von HNSCCs mitverantwortlich gemacht. So gilt etwa das Kauen von Betelnüssen, welches vor allem im südostasiatischen Raum sehr verbreitet ist, als weiterer gesicherter Risikofaktor (Proia, Paszkiewicz et al. 2006). Auch eine Infektion mit Epstein-Barr-Virus (EBV) gilt als Risikofaktor, insbesondere für das nasopharyngeale Plattenepithelkarzinom (Zheng, Li et al. 2007). Darüber hinaus wird auch den Expositionen gegenüber bestimmten

Industriefarben, Treibstoffen und Metallstäuben ein erhöhtes Risiko für HNSCC, insbesondere Larynx-Karzinomen, zugeschrieben (Brown, Mason et al. 1988).

Klinische Symptome eines Patienten mit HNSCC sind zumeist eher uneinheitlich und variieren je nach Lokalisation und Komorbiditäten. Typische Beschwerden sind neu aufgetretene Haut- und Schleimhauteffloreszenzen, Funktionsstörungen wie Kieferklemme oder Doppelbilder. Weitere Symptome sind Gefühls- bzw. Funktionsausfälle wie eine Fazialisparese, Dysphagie, Otagie, Dysphonie, Globusgefühl und Dyspnoe (Tumorzentrum-München 2014). Ein weiterer klinischer Hinweis auf eine Tumorerkrankung im Kopf-Hals-Bereich kann eine neu entstandene, schmerzlose Schwellung der cervikalen Lymphknoten sein. Gleichzeitig könnte dies bereits ein Hinweis für eine lymphogene Metastasierung des Tumors bedeuten, was wiederum weitreichende Behandlungskonsequenzen nach sich ziehen würde. In jedem Fall ist es eine ernstzunehmende Krankheit, die für den Betroffenen oft mit hohem Leidensdruck verbunden ist. Häufig sind Patienten durch ihre Erkrankung in den Aktivitäten des täglichen Lebens beeinträchtigt, können dies allerdings teilweise durch Organdysfunktionen nicht entsprechend artikulieren. In diesem Zusammenhang wird der Begriff „Quality of Life“ (QoL) verwendet, der auch die psychoonkologische Komponente dieser Erkrankung miteinbezieht (Deutschinoff, Friedrich et al. 2005). Ein psychosozialer Aspekt von Tumorerkrankung ist die gehäufte Komorbidität mit Depressionen (Haisfield-Wolfe, McGuire et al. 2009). In dem hier vorliegenden Kollektiv betrug die Depressionsrate 8,7%, was in etwa der Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung entspricht (Jacobi, Höfler et al. 2016). Erfasst wird diese QoL mittels unterschiedlicher Fragebögen, wie etwa dem „European Organization for Research and Treatment Quality of Life Head & Neck 35“ (EORTC QOL H&N 35). Dieser berücksichtigt Faktoren wie Schluckbeschwerden, Sinnes- und Sprachbeeinträchtigungen, Sozialkontakte sowie Sexualverhalten (Hernández-Vila 2016).

Strukturierte Patientenfragebögen ermöglichen nicht nur die Auswirkungen einer Erkrankung und deren Behandlung auf das Leben des Patienten zu quantifizieren, sondern helfen vielmehr auch gemeinsam mit dem Patienten individuell für ihn geeignete Therapie- und Rehabilitationsmöglichkeiten festzulegen, sowie seine persönlichen Motivationsabsichten festzuhalten und miteinzubeziehen (Vartanian, Rogers et al. 2017).

2.1.4 Diagnostik

Neben einer orientierenden allgemeinärztlichen Untersuchung ist eine spezielle Untersuchung der betroffenen Region durch einen Facharzt für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde in der Diagnosefindung notwendig (Munscher, Prochnow et al. 2019). Die Anamneseerhebung sollte unbedingt die Erfragung von Tumorrisikofaktoren wie Nikotin- und Alkoholabusus enthalten. Eine gezielte klinische Untersuchung in Kombination mit den vorliegenden Symptomen und der Anamnese kann erste Hinweise auf die vorliegende Tumordignität, Lokalisation, das

Ausmaß und Stadium der Raumforderung geben. Eine klinische Symptomatik kann bei diesen Tumoren allerdings auch lange Zeit völlig fehlen (Tumorzentrum-München 2014).

Besteht ein klinischer Verdacht, so sollten ab diesem Zeitpunkt weiterführende apparative Diagnostik und ein Tumor-Staging erfolgen. Dazu zählen insbesondere die Endoskopie, die Sonografie, die Computertomographie, die Magnetresonanztomografie (MRT), die Positronenemissionstomografie (PET), die kombinierte Positronenemissionstomografie-Computertomographie (PET-CT) und die Szintigrafie (Spector, Gallagher et al. 2014). Der Sonografie kommt dabei eine wichtige Bedeutung in der Beurteilung des Krankheitsverlaufes zu, da sie zur kostengünstigen und schnellen Detektion von Lymphknotenmetastasen geeignet ist. Die Limitation der Aussagekraft dieser Untersuchung liegt allerdings in individuellem Können und der Erfahrung des Untersuchers (Mast 2014).

Für das PET-CT, die kombinierte Anwendung von PET und CT, zeigten sich bessere Ergebnisse in der Detektion von malignen Läsionen im Kopf-Hals-Bereich als bei bloßer Anwendung einer der beiden Methoden (Branstetter, Blodgett et al. 2005).

Eine besondere Bedeutung sowohl für die Detektion als auch für das Staging von HNSCCs kommt dem CT zu. Aufgrund einer Ortsauflösung von bis zu 15 Linienpaaren pro Zentimeter, sowie der Möglichkeit der Kontrastmittelapplikation, können maligne Tumore und deren räumliche Ausbreitung exakt erfasst werden. Zusätzlich können aus Mehrzeilen-CT-Datensätzen Bilder in jeder räumlichen Orientierung rekonstruiert werden. Die klassische Röntgen-Thorax-Aufnahme in zwei Ebenen ist ebenfalls Bestandteil des primären Stagings und der Nachsorge. Bei ausgedehnten Malignomen (T3 und T4 Stadium nach UICC) sollte eine jährliche CT-Untersuchung des Thorax durchgeführt werden (Mast 2014). Trotz dieser großen Anzahl an Untersuchungsmöglichkeiten bleibt nach wie vor bei bis zu 5% der HNSCCs der Primärtumor unentdeckt (Cancer of Unknown Primary, CUP) (Argiris, Karamouzis et al. 2008).

2.1.5 Therapie

Ein frühes Erkennen der Symptome und eine rasche Diagnosestellung von HNSCCs sind wesentlich für die weitere Therapieplanung und den gesamten Krankheitsverlauf (Argiris, Karamouzis et al. 2008). Die Behandlung ist komplex und erfordert ein Zusammenspiel der chirurgischen Disziplinen, wie HNO und Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie, sowie internistischer Onkologie und Strahlentherapie. Lange Zeit galten die Bestrahlung und chirurgische Entfernung als Standardbehandlungsmethoden. Auch heute noch sind sie wichtige Eckpfeiler der Gesamttherapie. Die moderne Wissenschaft erlangte in den letzten Jahren allerdings ein immer besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, welche neoplastische Veränderungen, Tumor-Progression und Tumor-Verhalten antreiben (Bose, Brockton et al. 2013). Folglich verlagert sich auch der Fokus der modernen Behandlung von einer Radiochemotherapie auf gezielte Inhibierung beziehungsweise Aktivierung bestimmter

molekularer Ziele und Bahnen, der sogenannten Target-Therapie (Nowak, Soria et al. 2012). Neben dem primären Ziel, die Überlebenszeit und die Symptome des Patienten zu verbessern, spielt vor allem die Erhaltung der Lebensqualität, die aus der weitgehenden Wiederherstellung der Funktionalität und Ästhetik resultiert, eine große Rolle in der Therapieplanung (Mast 2014). Viele der Tumore werden erst in lokal fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und haben sich zu diesem Zeitpunkt bereits in der Umgebung ausgebreitet. Das und zudem eine hohe Anzahl an Begleiterkrankungen erklären auch, dass lediglich 40% der Patienten mit Karzinomen im Stadium III und IVA nach UICC, sowie lediglich 15% der Patienten mit Tumoren im Stadium IVB noch 5 Jahre nach Diagnosestellung leben (Mast 2014). Deshalb gilt es, vor Beginn jeder Maßnahme, gemeinsam mit den unterschiedlichen Fachdisziplinen und dem Patienten die Zielsetzung der Therapie genau zu definieren. Je nach Tumorstadium und weiteren Faktoren wird zwischen einer kurativen oder palliativen Therapie entschieden.

Die chirurgische Therapie hat als primäres Behandlungsziel eine R0 Resektion des Tumors. Dieser Wunsch steht oft im Gegensatz zum anatomischen Ausmaß des Tumors und dem Wunsch nach Organerhalt. Etwa ein Drittel aller HNSCCs werden im Stadium I oder II diagnostiziert (Argiris, Karamouzis et al. 2008). In diesen Stadien ist eine chirurgische Therapie mit kurativer Absicht indiziert. Je nach Ausmaß des Primarius, der Resektionsgrenzen und abhängig von einer lymphogenen Metastasierung ist die Radiatio eine zusätzliche Option. So gelingt für 90% der Patienten im Stadium I und für 70% der Patienten im Stadium II eine Heilung (Argiris, Karamouzis et al. 2008). Eine Halslymphknotenausräumung (Neck Dissection, ND) ist, neben der Entfernung des Primärtumors, ein zentraler Bestandteil des chirurgischen Behandlungskonzeptes von HNSCCs mit lymphogener Metastasierung bzw. Metastasierungspotential (Mast 2014). Eine 2015 veröffentlichte randomisierte Studie konnte zeigen, dass eine elektive ND bei Tumoren im Frühstadium (T1 und T2) das Gesamtüberleben verbessern kann (D'Cruz, Vaish et al. 2015).

Auch für lokal fortgeschrittene Tumore (Stadium III und IV) wird zunächst eine chirurgische Sanierung angestrebt. Ist eine R0 Resektion aufgrund von Komorbiditäten oder Tumorfiltration in umliegendes Gewebe nicht realisierbar, so ist im weiteren Behandlungsplan eine postoperative Radiochemotherapie vorgesehen (Pignon, le Maître et al. 2009). Meist erfolgt dies mittels Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) in Kombination mit Cisplatin. So konnten einige Studien zeigen, dass die Cisplatin-basierte Chemotherapie in Kombination mit der Radiotherapie besonders vielversprechend hinsichtlich lokoregionaler Tumorkontrolle, krankheitsfreiem Intervall (Disease Free Survival, DFS) und Gesamtüberleben (Overall Survival, OS) ist (Bernier, Domenge et al. 2004, Bonner, Harari et al. 2006, Fietkau, Barten et al. 2006, Semrau, Mueller et al. 2006). In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies zumindest eine Zunahme der 5-JÜR von 4% (Pignon, Bourhis et al. 2000).

Bei Patienten mit fortgeschrittenem Stadium, die als inoperabel eingestuft werden, ist die Bestrahlung in Kombination mit der Chemotherapie die Standardtherapieform (Adelstein, Li et al. 2003). Cisplatin, Carboplatin, Paclitaxel, Docetaxel, 5-Fluoruracil und der monoklonale Antikörper Cetuximab gelten hier als Standardmedikamente. Insbesondere Cetuximab scheint in der palliativen Situation nach neueren Erkenntnissen hinsichtlich des Gesamtüberlebens den Cisplatin-haltigen Chemotherapeutika überlegen zu sein (Huang, Zhang et al. 2016).

Bei Tumorrezidiven, Zweitumoren oder Fernmetastasen ist in vielen Fällen ein chirurgisches Eingreifen nicht mehr möglich. Der Behandlungsplan erfolgt daraufhin palliativ mittels alleiniger Chemotherapie. Für Patienten mit akzeptablem Allgemeinzustand ist das Mittel der Wahl eine Kombination von Cetuximab mit Cisplatin oder Carboplatin mit 5-Fluoruracil (Gregoire, Lefebvre et al. 2010). Für diese Kombinationen konnte ein verbessertes Gesamt-, sowie krankheitsfreies Überleben nachgewiesen werden (Vermorken, Mesia et al. 2008).

Im Falle einer Radiotherapie erfolgt diese perkutan in täglichen Dosen von 2 Gray bis zu einer Gesamtdosis von 70 Gray verteilt auf insgesamt 7 Wochen (Burtneß, Manola et al. 2008). Moderne Radiotherapie sollte 3D-konforme Radiotherapie oder IMRT beinhalten, um gesundes Gewebe zu schonen (Gregoire, Lefebvre et al. 2010).

Das bessere Verständnis der molekularen Vorgänge ermöglicht es der Wissenschaft gezielt einige Schlüsselenzyme der Tumorentstehung zu steuern. Seit einigen Jahren ist der EGFR-Blocker Cetuximab für lokal metastasierte HNSCCs als sogenannte Target-Therapie zugelassen. Die beiden Immunmodulatoren Pembrolizumab und Nivolumab wurden von der FDA 2016 im Falle einer nicht ausreichend Wirkung einer Cisplatin-Therapie bei Rezidiven zugelassen (Chow, Haddad et al. 2016). Zahlreiche klinische Versuchsreihen beschäftigen sich derzeit mit der Rolle dieser Immunmodulatoren als Monotherapie, sowie ihrer Rolle in Kombination mit den etablierten Methoden wie Chemo- und/oder Radiotherapie (Prasad and Kaestner 2017, Cohen, Bell et al. 2019).

Trotz all dieser Fortschritte auf molekularer Ebene steht noch immer der Patient als Mensch mit all seinen Sorgen und Wünschen im Mittelpunkt der Behandlung. Multimodale Konzepte, die auch Psychosomatik und psychoonkologische Aspekte betrachten, sind deswegen unumgänglich (Mast 2014).

2.1.6 Molekularpathologie des Plattenepithelkarzinoms

Neben den makroskopisch sichtbaren Veränderungen finden auch auf mikroskopischer Ebene zahlreiche Umbauprozesse statt. Das Wachstumsverhalten der Plattenepithelkarzinome ist dabei maßgeblich bedingt durch ein Wechselspiel der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, sowie der simultanen Aktivierung von Protoonkogenen durch Deletionen, Punktmutationen, Promoter-Methylierungen und Gen-Amplifikationen (Perez-Ordóñez, Beauchemin et al. 2006). In weiterer Folge führt dies zu genetischen Instabilitäten (Argiris, Karamouzis et al. 2008).

PCR-basierte Mikrosatelliten-Analysen erlaubten es, ein Model für das genetische Fortschreiten von HNSCCs, basierend auf den Häufigkeiten dieser genetischen Alterationen in prä-invasiven Läsionen sowie invasiven Tumoren zu erstellen (Califano, van der Riet et al. 1996, Califano, Westra et al. 2000). Abbildung 1 skizziert dieses Model.

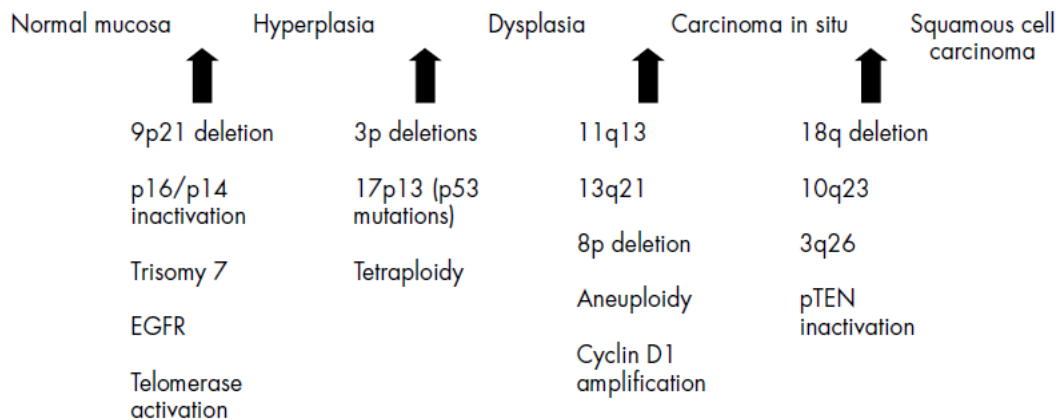


Abbildung 1: Hypothetisches Model für die Entstehung von HNSCC (Califano, van der Riet et al. 1996)

Demnach findet sich in bis zu 80% der HNSCCs ein Heterozygotenverlust (Loss of Heterozygosity, LOH) der Region 9p21. Ebenso wird ein Verlust der Region 3p beobachtet, welcher in bis zu 70% der HNSCCs vorliegt. Somit stellen diese beiden die häufigsten genetischen Veränderungen dar, die in Dysplasien bzw. HNSCCs beobachtet werden können (Perez-Ordóñez, Beauchemin et al. 2006). Deletionen wie diese können einen Zellzyklusarrest zur Folge haben, beispielsweise durch die Inaktivierung von p16 und p14^{ARF}, welche normalerweise für die G₁-Zellzyklusregulation oder den MDM2-gesteuerten Abbau von p53 zuständig sind. Insbesondere p16 ist in HNSCCs häufig inaktiviert (Califano, van der Riet et al. 1996).

LOH von 17p und Punktmutationen des Tumorsuppressorgens p53 können in bis zu 50% der HNSCCs beobachtet werden (Nawroz, van der Riet et al. 1994, van Houten, Tabor et al. 2002). Die meisten dieser Mutationen tauchen erst sehr spät in der Progression einer epithelialen Dysplasie zu einem invasiven Karzinom auf (Shahnavaz, Regezi et al. 2000).

Bei etwa 20% der HNSCC-Patienten finden sich weißliche, nicht abwischbare Flecken auf der Schleimhaut, sogenannte Leukoplakien. Diese sind die häufigsten prä-malignen Läsionen, die Zeichen von makroskopisch sichtbaren Dysplasien aufweisen (Mast 2014). Diese Läsionen stellen als sogenannte Präkanzerosen einen Zwischenschritt in der HNSCC-Progression dar und bedürfen besonderer Beachtung. Etwa 5% der diagnostizierten Leukoplakien entwickeln sich in weiterer Folge zu HNSCCs. Jedoch findet sich lediglich bei 25% aller HNSCCs eine Vorläuferläsion in Form einer solchen Leukoplakie (Neid and Tannapfel 2009). Als

Haupttrisikofaktor für die Entstehung von Präkanzerosen werden in der Literatur unter anderem übermäßiger Alkohol- und Tabakkonsum angeführt (Maserejian, Joshipura et al. 2006).

Ploidiestatus, Chromosomen-Polysomie und LOH-Analyse von oralen Präkanzerosen können ebenfalls wichtige Informationen über das Risiko einer Progression zu einem Karzinom, sekundärer Karzinomentstehung und tumorspezifischem Tod liefern (Perez-Ordenez, Beauchemin et al. 2006).

2.2 Prozesse der Krebsentstehung

Auf molekularer Ebene werden derzeit vier wesentliche Prozesse diskutiert, welche eine Rolle in der HNSCC-Entstehung, ausgehend von einer gesunden Zelle hin zur Karzinomzelle spielen. Im Wesentlichen sind dies:

1. Zellzyklusregulation/Signaltransduktion
2. Krebsstammzellen
3. Immunmodulation
4. HPV-Infektion

Im folgenden Abschnitt wird jeder dieser Bereiche beschrieben. Im Anschluss daran werden im folgenden Kapitel ausgewählte Biomarker/Enzyme aus jedem Abschnitt, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, genauer erläutert.

Im Bereich der Signaltransduktion/Zellzyklusregulation werden folgende vier Enzyme und deren nachgeschaltete Signalwege für die Entstehung von HNSCCs diskutiert (Bose, Brockton et al. 2013):

1. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)
2. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGF)
3. Phosphatidylinositol-3-Kinase-AKT-Mammalian Target of Rapamycin (PI3K-Akt-mTOR)
4. Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK STAT)

Der EGFR ist ein Mitglied der „ErbB Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase“ Familie, welche eine zentrale Rolle in der Tumorbilogie der HNSCCs spielt (Karamouzis, Grandis et al. 2007). Ligandenbindung führt zur Aktivierung einer molekularen Kaskade, die unter anderem Zellproliferation, Apoptose, Metastasierungspotential und Angiogenese regeln (Argiris, Karamouzis et al. 2008). EGFR-Expression kann in bis zu 90% der HNSCCs beobachtet werden (Grandis and Twardy 1993). Es ist daher naheliegend, dass sich viele Forschungsarbeiten mit einem Therapieansatz in und um diesen Rezeptor beschäftigen. Gezieltes Ausschalten dieses Rezeptors wurde bereits erfolgreich für Therapien genutzt (Karamouzis, Grandis et al. 2007). Auch unserer Forschungsgruppe für molekulare Onkologie gelang hierbei ein bedeutender Beitrag zum besseren Verständnis dieses Signalweges.

Konkret konnte beobachtet werden, dass die in-vitro Blockade des EGFR-Rezeptors die Tumorzell-Migration unter Radiatio reduziert (Pickhard, Margraf et al. 2011).

Angiogenese ist wesentlich für die Fähigkeit des Tumors zu wachsen und zu metastasieren. Dieser Vorgang wird von zahlreichen Faktoren gesteuert, von denen der bekannteste wohl der VEGF ist. Dementsprechend naheliegend ist auch der Versuch eines Therapieansatzes in der Inhibierung der Angiogenese. Obwohl die Bedeutung des VEGF bereits für andere Tumorarten bestätigt wurde, bleibt der Grad der Bedeutung bei HNSCCs Gegenstand kontroverser Diskussionen. Insbesondere erhofft man sich in Zukunft durch individualisierte anti-angiogene Behandlungsmöglichkeiten, basierend auf molekulargenetischer Tumor-Charakterisierung, ein verbessertes Therapieansprechen für HNSCC-Patienten (Micaily, Johnson et al. 2020).

Der PI3K-Signalweg ist einer der am häufigsten aktivierten Signalwege in der Krebsentstehung (Vivanco and Sawyers 2002). Physiologisch regelt PI3K etwa das Zell-Überleben, die Proliferation und Differenzierung (Engelman, Luo et al. 2006). Nach Aktivierung gerät eine Signalkaskade in Gang, die unter anderem auch Proteinkinase B (Yu, Weinberger et al. 2007), sowie das Tumorsuppressor-Protein „Phosphatase and Tensin Homolog“ (PTEN) enthält. Erstere regelt dabei hauptsächlich anabole zelluläre Überlebensprozesse, während zweiteres die Signaltransduktion durch den PI3K-Signalweg blockiert (Bose, Brockton et al. 2013). Weiter unten in dieser Signalkaskade folgt mTOR, welches eine Rolle für die Regelung der Energiequellen und Verfügbarkeit von Nährstoffen für die Zelle spielt. Mutieren nun die Gene, die für PI3K kodieren oder geht der negative Regulator PTEN verloren, kommt es zur irrtümlichen Aktivierung des PI3K-Signalweges und möglicher konsekutiver Malignitätsentstehung. So sind Mutationen dieser Gene in HNSCCs etwa mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium, erhöhter Gefäßinvasion sowie Lymphknotenmetastasen assoziiert (Bose, Brockton et al. 2013).

Ebenso wird dem JAK-STAT Signalweg eine mögliche Beteiligung an der Karzinogenese der HNSCCs zugeschrieben, indem er Einfluss auf das Zellüberleben und Wachstum, Angiogenese sowie Unterdrückung der Immunkontrolle nimmt (Sriuranpong, Park et al. 2003). Ferner werden Krebsstammzellen (Cancer Stem Cells, CSC) als mögliche Treiber im Tumorprogress von HNSCCs diskutiert. Diese besonderen Zellen besitzen die uneingeschränkte Fähigkeit zur Proliferation, was wiederum zu verstärktem Nicht-Ansprechen auf konventionelle Therapie (Radio-, und/oder Chemotherapie) führen kann (Dong, Ochsenreither et al. 2017). Aus diesen Gründen werden sie als essenziell für Tumorinitiation, -erhaltung, Rezidivneigung und Metastasierungspotential angesehen. Es konnte gezeigt werden, dass CSCs im Zusammenhang mit dem Epithelialen-Mesenchymalen-Übergangsprozess (EMT) stehen, indem sie etwa zum Verlust der Zellpolarität und Zell-Zell-Adhäsion beitragen (Ishiwata 2016). All diese Vorgänge tragen zur Veränderung der Zellstruktur bei und ermöglichen es diesen Zellen über die Grenzen des Primärtumors hinaus

zu migrieren und Lymph- bzw. Blutgefäße zu befallen (De Craene and Berx 2013). Tatsächlich gelten CSCs in Tumorzellen als jene Zellen mit dem höchsten Migrations- und folglich Metastasierungspotential. Ihre Identifizierung wurde als möglicher Angriffspunkt für die Target-Therapie gegen Krebs vorgeschlagen (Nassar and Blanpain 2016). In diesem Zusammenhang haben Studien gezeigt, dass in CSCs Zelloberflächenmarker wie CD44 oder ALDH1, die bereits in verschiedenen soliden Tumoren identifiziert wurden, verstärkt exprimiert werden (Michifuri, Hirohashi et al. 2012, Qian, Ma et al. 2015). Diese beiden Marker werden in Abschnitt 2.7 genauer beschrieben.

In den letzten Jahren gewann das Feld der Immunmodulation auch im Zusammenhang mit HNSCCs mehr und mehr an Bedeutung. Intakte Immunüberwachung innerhalb der Zelle ist für die Unterdrückung der Karzinogenese von entscheidender Bedeutung. Um sich lokal vermehren und metastasieren zu können, müssen Krebszellen bestimmte Mechanismen entwickeln, die es ihnen ermöglichen, die Eliminierung durch das Immunsystem des Wirts zu umgehen. Die Immuntherapie arbeitet mit der Grundidee, dass das Immunsystem des Wirts aktiviert werden kann, um diese erworbenen Mechanismen der Immunevasion des Tumors zu überwinden. Dadurch werden Krebszellen als körperfremde Zellen erkannt und können so eliminiert werden (Forster and Devlin 2018). HNSCCs stellen eine der am häufigsten immuninfiltrierten Tumorentitäten überhaupt dar (Mandal, Senbabaoglu et al. 2016).

Ebenfalls beobachtete man in den letzten Jahren die Zunahme der Inzidenz von HPV-assoziierten HNSCCs. Die Infektion mit Hochrisiko-HPV-Typen fördert die Tumorgenese durch Expression seiner Onkoproteine E6 und E7 (Bose, Brockton et al. 2013). HPV-positive Tumore zeigen im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren ein erhöhtes Ansprechen auf Radiochemotherapie (Gottgens, Ostheimer et al. 2018). Aufgrund der Tatsache, dass dies zumeist eine jüngere Patientengruppe ohne längerer Noxenexposition und Multimorbidität betrifft, zeigt sich für diese eine verbesserte Prognose im Vergleich zu nicht-HPV-assoziierten HNSCCs. So haben HPV-assoziierte HNSCC-Patienten eine 3-Jahres-Überlebensrate von 82,4%, verglichen mit 57,1% bei nicht-HPV-assoziierten Patienten (Ang, Harris et al. 2010). Dies bietet die Möglichkeit, die Mechanismen der Strahlenempfindlichkeit aufzuklären, welche wiederum Ziele für eine verbesserte Therapie bei nicht-HPV-assoziierten HNSCCs sein könnten (Gottgens, Ostheimer et al. 2018).

Abschließend soll in diesem Abschnitt auch festgehalten werden, dass zwischen all diesen Signalwegen mögliche Querverbindungen bestehen. Dies könnte bedeuten, dass therapeutisches Behandeln einer dieser Kaskaden eine Modulierung anderer zur Folge haben könnte. Es bedarf weiterer klinischer sowie experimenteller Untersuchungen, um die genauen Zusammenhänge auf molekularer Ebene zu verstehen (Bose, Brockton et al. 2013). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Proteine aus allen der oben

beschriebenen Signalwege ausgewählt und deren Potenzial als prognostische Biomarker sowie deren mögliche Interaktionen in HNSCCs untersucht. Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über den aktuellen Forschungsstand der in dieser Arbeit untersuchten Marker.

2.3 Biomarker

Bis vor kurzem galten die TNM-Klassifikation sowie die Noxenbelastung der Patienten als zuverlässigste prognostische Faktoren für die Überlebenswahrscheinlichkeit von HNSCC-Patienten. Da diese die Unterschiede, die sich vor allem auf molekularer Ebene abspielen, nicht berücksichtigen, ermöglichen sie keine individuelle Vorhersage innerhalb der Patientengruppen mit gleichem TNM-Stadium (Economopoulou, de Bree et al. 2019). Deshalb besteht großes Interesse an der Identifikation von Biomarkern, die eine Einordnung in ein individuelles Risiko- und Therapiekonzept ermöglichen. Biomarker sind laut National Cancer Institute (NCI) definitionsgemäß "biologische Moleküle, welche in Blut, Gewebe oder anderen Körperflüssigkeiten zu finden sind und Zeichen von natürlichen oder unnatürlichen Prozessen oder Krankheiten darstellen" (NCI 2001). Biomarker können zeigen, wie gut der Körper auf eine gewisse Therapie oder Zustand anspricht (Pardoll 2012). Trotz großer Bemühungen haben sich bislang für HNSCCs wenige Biomarker dauerhaft beweisen können. Mit der von unserer Forschungsgruppe getätigten Auswahl an Biomarkern aus allen vier weiter oben beschriebenen Prozessen der Krebsentstehung soll eine solche Stratifizierung einerseits hinsichtlich krankheitsspezifischer Überlebensprognose und in weiterer Folge hinsichtlich Verhaltens des Tumors unter Strahlentherapie erfolgen.

2.3.1 Signaltransduktionsmoleküle

2.3.1.1 pAkt (Proteinkinase B)

Der PI3K/Akt-Signalweg ist einer der am häufigsten fehlregulierten Signalwege in humanen Krebsformen und hat somit Auswirkungen auf beinahe alle Aspekte von bösartigem Krebswachstum (Szymonowicz, Oeck et al. 2018). PI3K wird beispielsweise durch Tyrosinkinase-Transmembranrezeptoren und andere Signal-Moleküle, wie Ras-Onkogenen und G-Proteinen aktiviert (Rodriguez, Garcia-Gonzalez et al. 1994). Durch eine nachfolgende Signalkaskade wird Akt an der Zellmembran schließlich phosphoryliert und somit aktiviert. Im Zellkern werden folglich mittels der Informationen, die durch die Signalkaskaden weitergegeben wurden, bestimmte Gene transkribiert. Diese Akt-Substrate sind dann an verschiedenen Prozessen in der Zelle beteiligt, wie etwa Proliferation (p27, CycD1, Foxo3a, u.a.), Stoffwechsel (GSK3 β , GLUT4, u.a.), Überleben (BCL2-associated Agonist of Cell Death, Bad, Caspase 9 u.a.) und Zellwachstum (mTOR, PDE3B u.a.) (Szymonowicz, Oeck et al. 2018). Einige der Akt-Aktivitäten führen zu einer verstärkten Zellproliferation bei gleichzeitig verminderter Apoptose. Deswegen wird Akt in seiner aktivierten Form als Proto-Onkogen angesehen (Moral and Paramio 2008).

Wie in Abbildung 2 ersichtlich, stimulieren die Nachfolgemoleküle von PI3K, PIP₂ und PIP₃ die Phosphorylierung und Aktivierung von Akt. Sobald Akt aktiviert ist, kann es zelluläre Prozesse durch Phosphorylierung von Substraten, die die Apoptose (gezeigt in rot), Proteinsynthese (gezeigt in blau), Metabolisierung (gezeigt in grün) und Zellzyklus (gezeigt in grau) regeln steuern. Pfeilspitzen zeigen Aktivierung von Signalkaskaden; aufrechte Linien zeigen Inhibierung von Signalkaskaden (West, Castillo et al. 2002).

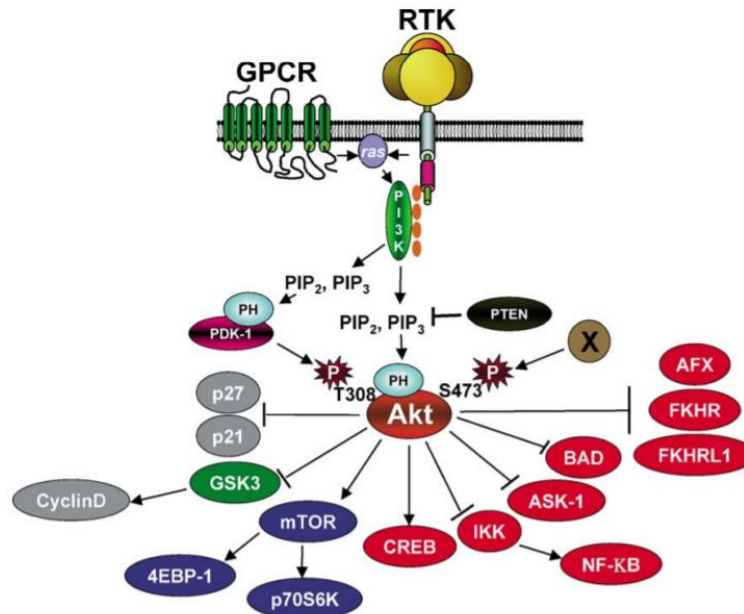


Abbildung 2: Überblick über den PI3K/Akt Signalweg. Der PI3K/Akt Signalweg kann durch Rezeptortyrosinkinasen (RTK), Ras-Aktivierung, Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) oder durch Inaktivierung des Tumorsuppressors PTEN aktiviert werden (West, Castillo et al. 2002)

Die 3 Isoformen pAkt1, pAkt2 und pAkt3 werden durch unterschiedliche Gene auf den Chromosomen 14q32.32, 19q13.1 und 1q44 codiert. Mehrere Studien haben eine Veränderung von Akt-Familienmitgliedern in mehreren humanen Krebsformen, wie etwa Brust-, Eierstock-, Prostata-, aber auch in bis zu 60% der Kopf- und Halstumore festgestellt (Sun, Paciga et al. 2001, Amornphimoltham, Sriuranpong et al. 2004, Segrelles, Moral et al. 2006). Gesteigerte Akt-Aktivierung steht in Zusammenhang mit schlechtem klinischem Ergebnis, höherer lokaler Metastasierungsrate und vermindertem Gesamtüberleben (Massarelli, Liu et al. 2005, Yu, Weinberger et al. 2007). Yu et al. konnten so etwa für Patienten, bei denen im Tumor niedrig-exprimiertes pAkt vorlag, eine geringere 5-Jahres-Rezidivrate (5% versus 38%) nachweisen. Zusätzlich hatten diese Patienten eine verbesserte 5-JÜR (45% versus 27%). Dieser Überlebenseffekt ist wohl auf die höhere Rezidivrate bei pAkt-Überexpression zurückzuführen. So konnte in weiteren Analysen die pAkt-Expression im Tumorgewebe als starker Prädiktor für lokale Rezidive gefunden werden. Ferner wurde eine inverse Beziehung zwischen pAkt und PTEN gefunden: Tumore, mit hoher

pAkt-Expression wiesen niedrige PTEN-Expressionen auf und vice versa (Yu, Weinberger et al. 2007). PTEN konvertiert PIP3 wieder zu PIP2 und kann somit den von PI3K-initiierten Signalweg sowie weitere Akt-Aktivierung in Folge beenden. PTEN ist damit der stärkste natürliche Gegenspieler/Regulator von Akt (Moral and Paramio 2008).

Der PI3K/Akt-Weg reguliert aber nicht nur Zellproliferation und Überleben, erhöht die Proteinsynthese und den Stoffwechsel, sondern ist darüber hinaus auch aktiv an der Entstehung von Krebsmetastasen beteiligt (Bruhn, Pearson et al. 2010). Insbesondere wird diskutiert, ob Akt zu erhöhter Zellbeweglichkeit und folglich vermehrter Metastasenbildung führen kann (Xue and Hemmings 2013).

Ein weiteres Phänomen, das auch in HNSCC-Tumorzellen vermehrt beobachtet werden kann, ist die Aktivierung von Akt durch Hypoxie (Alvarez-Tejado, Naranjo-Suarez et al. 2001). Diese gilt als gemeinsame Eigenschaft von soliden Tumoren und wird als prognostischer Marker für schlechteres Therapieansprechen angesehen (Vaupel and Mayer 2007). Stegeman et al. konnten 2012 zudem nachweisen, dass hypoxische HNSCC-Zellen deutlich empfindlicher gegen Akt-Inhibierung waren als normoxische (Stegeman, Kaanders et al. 2012). In der Klinik sind Krankheiten wie Diabetes und Krebs eng mit abweichender Akt-Aktivität verbunden. Dies hat zahlreiche Versuche im Therapieansatz nach sich gezogen, spezifische Akt-Inhibitoren zu entwickeln. Die einzelnen Akt-Unterformen können hierbei allerdings gegenläufige Funktionen haben. Um ungewollte Nebenwirkungen der Target-Therapie zu vermeiden, müssen diese Wechselwirkungen noch eingehend erforscht werden (Xue and Hemmings 2013).

2.3.1.2 Hypoxie-induzierter Faktor (Hif1 α)

Ein niedriger intratumoraler Sauerstoffpartialdruck (pO₂) ist in vielen Tumorentitäten ein Prädiktor für verminderte Strahlenempfindlichkeit und geringeres Gesamtüberleben (Brizel, Dodge et al. 1999). In hypoxischen Bereichen des Tumors kommt es zu vermehrter Expression des „Hypoxie-induzierten Faktors“, von dem es mehrere Untertypen gibt (Michifuri, Hirohashi et al. 2012). Dieser ist ein Transkriptionsfaktor, der physiologisch für die Balance zwischen Sauerstoffangebot und Bedarf sorgt. In Tumorzellen transaktiviert er verschiedene Zielgene, wie Glukose-Transporter, glykolytische Enzyme oder VEGF. All diese Vorgänge sind natürliche Reaktionen des Tumors auf sich ändernde Umgebungseinflüsse mit dem Ziel, seine Nährstoffzufuhr und somit sein Überleben zu sichern (Semenza 2000). Somit spielt Hif1 α eine zentrale Rolle in der Tumor-Entstehung (Blancher, Moore et al. 2000). Gesteigerte Hif1 α -Expression ist zumeist mit vermehrter Metastasenbildung, gesteigerter Angiogenese, schlechterer Prognose, schlechtem Therapieansprechen sowie aggressiverem Tumorverhalten assoziiert (Masoud and Li 2015). Zudem beeinflusst Hypoxie auch die Empfindlichkeit gegenüber Strahlentherapie, da die Bildung freier Radikale, die den Zelltod durch DNA-Strangbrüche induzieren, von Sauerstoff abhängt. Folglich trägt Hypoxie zu

vermehrter Strahlen-, aber auch Chemoresistenz bei (Hosokawa, Okumura et al. 2012, Masoud and Li 2015). Ein möglicher Therapieansatz wäre durch gezielte Inhibierung der Mediatoren der pathologischen Angiogenese die Strahlenempfindlichkeit zu erhöhen. Ein mögliches Medikament dafür ist etwa der Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib (Matsumoto, Batra et al. 2011).

Hif1 α kann außerdem auch über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg aktiviert werden (Onoyama, Kitadai et al. 2013). Zahlreiche Studien belegen, dass die Interaktion zwischen dem Akt- und Hif1 α -Signalweg eine wichtige Rolle für das hypoxische Zellüberleben und Hypoxie-induzierte Strahlungsresistenz spielen (Stegeman, Kaanders et al. 2012). Vor allem mTOR als nachgeschaltetes Protein von Akt besitzt in seiner aktivierten Form die Fähigkeit zum Zellwachstum, zur Proliferation, zur Stoffwechsel- und T-Zell-Aktivierung (Perri, Pacelli et al. 2015). Eine Aktivierung von mTOR kann auf zwei unterschiedliche Weisen passieren: Entweder durch eine „Loss-of-Function“-Mutation von PTEN oder eine vermehrte Expression von EGFR (Yu, Weinberger et al. 2007). In aktivierter Form steuert mTOR die vermehrte Expression von Hif1 α . Unter anderem gelang es unserer Arbeitsgruppe, bereits gezielt den EGFR-Signalweg in vitro zu blockieren und somit eine vermehrte Expression von mTOR sowie Hif1 α zu unterbinden (Pickhard, Margraf et al. 2011).

Aufgrund der hohen Komplexität in der Regulierung des Hif1 α -Signalweges und der daran beteiligten Enzyme ist es allerdings bis heute noch nicht gelungen, einen selektiven Hif1 α -Inhibitor zu kreieren. Dies ist zumeist den verschiedenen Wechselwirkungen der Signalwege untereinander geschuldet (Masoud and Li 2015). Die spezifische Wechselwirkung zwischen Hypoxie, Hif1 α und Akt-Signalwegen in einem Tumor könnte allerdings eine wichtige Rolle für verschiedene neue Behandlungsstrategien spielen, wie beispielsweise in Form hypoxischer Modifikation oder Akt-Signalweg-Inhibitoren. Ein Einblick in die Wechselwirkung zwischen Hypoxie und Akt-Signalisierung könnte daher dazu beitragen, die Patientenauswahl und damit das Patienten-Outcome zu verbessern (Stegeman, Span et al. 2016).

2.3.1.3 Survivin (Baculoviral Inhibitor of Apoptose Repeat-Containing 5, BIRC5)

Der Zellzyklus ist definiert als der periodische Ablauf von Ereignissen in einer Zelle zwischen zwei Zellteilungen (Munk 2000). An der Regulation dieses Zyklus sind eine unterschiedliche Anzahl an Proteinen, aber auch innere und äußere Einflussfaktoren beteiligt. Zu den äußeren Umgebungseinflüssen zählen unter anderem Zellgröße, Verfügbarkeit von Nährstoffen oder Präsenz von Wachstumsfaktoren. Im Inneren der Zelle wird an speziellen Kontrollpunkten, sogenannten Checkpoints, der korrekte Ablauf des Zellzyklus überwacht und im Falle einer Fehlregulation der Zellzyklusarrest oder die Apoptose eingeleitet (Munk 2000).

Survivin (BIRC5) ist das kleinste Mitglied (16,5 kDa) der Apoptoseinhibitoren-Familie und greift maßgeblich in die Kontrolle des Zellzyklus ein (Antonia, Villegas et al. 2017, Pickhard, 2014). Bislang konnte Survivin lediglich in Tumorzellen nachgewiesen werden, nicht aber in

Normalgewebe (Sah, Khan et al. 2006). Seine übermäßige Expression scheint allerdings ein sehr frühes Ereignis in der Tumorentstehung zu sein (Ambrosini, Adida et al. 1997). Die Survivin-Expression kann bei verschiedenen Krebsarten durch mehrere Mechanismen reguliert werden, beispielsweise durch die Vergrößerung des Survivin-Locus auf Chromosom 17q25 (Islam, Kageyama et al. 2000), Demethylierung von Survivin-Exons (Hattori, Sakamoto et al. 2001), verstärkter Promoter-Aktivität (Li and Altieri 1999) oder verstärkter Signalwirkung in den Upstream-Signalwegen PI3K oder Mitogen-Activated-Protein-Kinases (MAPK) (Vaira, Lee et al. 2007).

Allgemein gilt eine hohe Survivin-Expression bei Tumorpatienten als prognostisch ungünstiger Faktor, korrelierend mit verringertem Gesamtüberleben in verschiedenen Malignitäten, wie kleinzelligem Lungen-, Magen-, Darm- und Brustkarzinom, sowie Neuroblastomen. Zudem wurde eine erhöhte Survivin-Expression in Zusammenhang mit erhöhten Rezidivraten, vermehrter Lymphknoteninvasion (N+) sowie vermehrter Metastasenbildung (M+) gebracht (Marioni, Bertolin et al. 2006, Osaka, Suzuki et al. 2006). Grundsätzlich besitzt Survivin zwei Hauptfunktionen:

1. Apoptose-Kontrolle: Survivin soll anti-apoptotische Eigenschaften besitzen. Dachte man früher, dass Survivin und andere IAPs selektiv an Caspasen (Caspase 3, 6, 9) andocken und deren Abbau initiieren (Altieri 2003), so zeigten neuere Studien eher eine indirekte Beteiligung von Survivin an der Apoptose. So bindet es nicht, wie ursprünglich angenommen, direkt an Caspasen, sondern lediglich an sekundäre mitochondriale Aktivatoren von Caspasen und besitzt somit als Zwischenglied die Fähigkeit die Apoptose zu stoppen (Song, Yao et al. 2003). Weiterführende Experimente zeigten zudem, dass Survivin doch in der Lage ist, die Caspasen 3 und 7 direkt zu binden, während hingegen für die Bindung von Caspase 9 ein Cofaktor wie das Hepatitis B X-interacting Protein (HBXIP) notwendig ist (Marusawa, Matsuzawa et al. 2003). Darüber hinaus kann Survivin auch einen Komplex mit X-interacting Protein (XIAP), einem weiteren starken Inhibitor der Apoptose, eingehen und dessen inhibierende Wirkung auf die Caspase 9 unterstützen (Dohi, Okada et al. 2004). Survivin inhibiert so im Zusammenspiel mit anderen IAPs die Aktivität von Smac/Diablo, den beiden bekanntesten pro-apoptotischen Proteinen (siehe Abbildung 3) (Khan, Khan et al. 2010, Athanasoula, Gogas et al. 2014).
2. Zellzyklus-Kontrolle: Survivin wird während der Mitose zumeist in der G2-M-Phase exprimiert. Es interagiert dann mit Tubulin und siedelt sich an den beiden subzellulären Spindelpolen an (Mita, Mita et al. 2008). Survivin ist somit zentraler Regulator während der Zellteilung, indem es an Zentrosom-Funktionen, an der Zusammensetzung der Mikrotubuli während der Meta- und Anaphase sowie an der Mitose-Checkpoint-

Regulierung beteiligt ist. Abbau von Survivin führt zu fehlerhafter Zellteilung über Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 (Altieri 2003).

In Zellen mit mangelnder Survivin-Expression treten häufiger Fehler im Zellteilungsprozess mit nachfolgender fehlerhafter Aufteilung der Chromatiden auf. Zwar wird die Zytokinese auch ohne Survivin normal gestartet, in weiterer Folge scheitert sie jedoch häufig in Zellen ohne Survivin-Expression aufgrund fehlerhafter Spindelzonen- und Mikrotubulizusammensetzung (Vivek, Kannan et al. 2011).

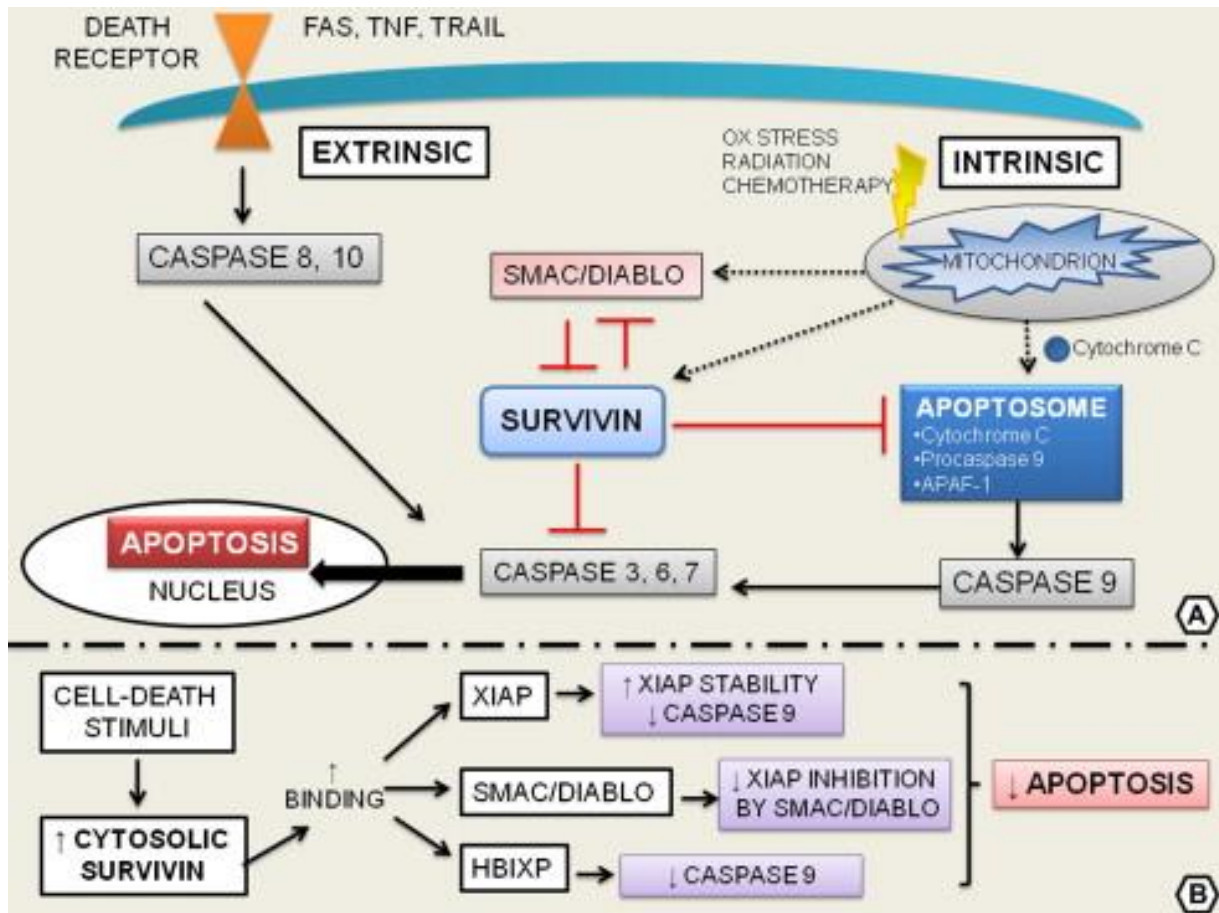


Abbildung 3: Rolle von Survivin in der Apoptose (Athanasoula, Gogas et al. 2014)

Darüber hinaus wird Survivin eine Rolle in der Tumor-Angiogenese nachgesagt, zumal es in Endothelzellen während der Proliferationsphase stark exprimiert wird (Tran, Rak et al. 1999). Ebenso konnte in vitro und in vivo nachgewiesen werden, dass die Inhibierung von Survivin das Tumorstadiumspotential reduziert und die Tumorzellen dadurch empfindlicher für chemotherapeutische Mittel wie Paclitaxel, Cisplatin, Etoposid, Gamma-Strahlung und Immuntherapie gemacht wurden (Zaffaroni and Daidone 2002). Auch die Rolle von Survivin in Zusammenhang mit Strahlentherapie wurde bereits kontrovers diskutiert. So fanden etwa Freier et al. heraus, dass erhöhte Survivin-Expression mit schlechterer Prognose und

geringerer Strahlenempfindlichkeit einhergeht (Freier, Pungs et al. 2007). Neuere Studien kamen allerdings zu einem gegenteiligen Ergebnis (Farnebo, Tiefenbock et al. 2013). Somit ist die Rolle Survivins in der Karzinogenese und Radiotherapie Gegenstand aktueller Forschung. Dennoch scheint dieser Biomarker nicht zuletzt aufgrund seiner Expression vorwiegend in malignem Gewebe ein ideales Ziel für eine Target-Therapie zu sein. So könnte in Zukunft ein zuvor identifiziertes Patientenkollektiv von der Bestimmung des Survivin-Status hinsichtlich Prognose- und Therapieplanung profitieren (Mita, Mita et al. 2008).

2.3.2 Krebsstammzellenmarker

Wie weiter oben bereits beschrieben, gehören Krebsstammzellen einer bestimmten Gruppe von Zellen innerhalb eines Tumors an, die eine uneingeschränkte Fähigkeit zur Proliferation besitzen, was wiederum zu verstärktem Nicht-Ansprechen auf konventionelle Therapie (Radio/Chemotherapie) führt (Dong, Ochsenreither et al. 2017). Die Theorie der CSCs besagt, dass spezielle CSCs in der Lage sind Tumorentstehung zu initiieren (Wicha, Liu et al. 2006). Allgemein werden Tumore mit positiver immunhistochemischer CSC-Expression mit höheren Metastasierungsraten und somit einer schlechteren Prognose assoziiert (Ortiz, Lopes et al. 2018). Unter Therapie behalten CSCs weitestgehend ihre tumorspezifischen Eigenschaften. Dies ermöglicht ihnen häufig ein Überleben während konservativer Tumortherapie und erhöht so die Rezidivrate. Eine zielgerichtete Eradikation von CSCs wird nicht zuletzt deshalb als wichtige Herausforderung in der gesamten Krebstherapie gesehen (Dong, Ochsenreither et al. 2017). Zwei Biomarker, die unter anderem in diesem Zusammenhang mit der Entstehung von HNSCCs diskutiert werden, sind CD44 sowie ALDH1.

2.3.2.1 Cluster of Differentiation 44 (CD44)

CD44 ist ein Transmembranglykoprotein und einer der Haupthyaluron-Rezeptoren, welche intrazelluläre Signale an die extrazelluläre Mikro-Umgebung weitergibt. Es wird als Adhäsions-Molekül beschrieben, das in verschiedensten Zelltypen (Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Leukozyten) auftritt (Swain, Routray et al. 2017). CD44 spielt eine Rolle in mehreren Signalwegen, welche unter anderem für Proliferation, Migration, Hämatopoese und Lymphozyten-Besiedlung zuständig sind (siehe Abbildung 4) (Jordan, Racine et al. 2015). Das CD44-Protein besteht aus drei funktionellen Domänen, einschließlich einer extrazellulären Domäne (Ektodomäne, ED), einer Transmembrandomäne (TM) und einer intrazellulären Domäne (ICD), die alle unterschiedliche Aufgaben besitzen (Swain, Routray et al. 2017).

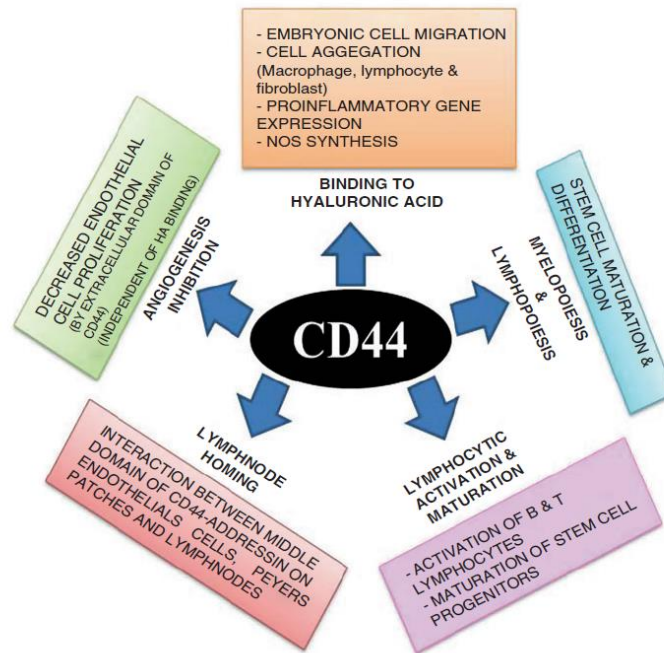


Abbildung 4: Die physiologischen Funktionen von CD44 (Swain, Routray et al. 2017)

Die Bedeutung für CD44 in der Tumorentstehung wurde bereits eingehend diskutiert. Diese könnte laut derzeitigem Stand der Forschung auf drei unterschiedlichen Wirkmechanismen beruhen:

1. Hyaluron-unabhängige Signalübertragung: CD44 besitzt sowohl aktivierende als auch inaktivierende Funktionen auf den Tumor (Sun, Yu et al. 2016). Welche Funktion ausgeführt wird, hängt davon ab, welcher Ligand an der zytoplasmatischen Seite gebunden wird. Wird etwa LRP6 (Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein 6) gebunden, kann CD44 den Wnt- β -Catenin-vermittelten Signalweg aktivieren, welcher die zytoskeletale Zusammensetzung verändert und somit zu vermehrter Zellbeweglichkeit beiträgt. So wurde beobachtet, dass CD44 die Zellproliferation und Migration über den MAPK-Signalweg beeinflussen kann. Im Gegensatz dazu kann CD44 auch in Kombination mit PP2A, einer Phosphatase, die Raf, MEK und Akt dephosphoryliert, die intrinsische Apoptose fördern, indem es die Phosphorylierungsrate von ERK herunternetzt (Swain, Routray et al. 2017).
2. Hyaluron-abhängige Signalübertragung: Die mögliche Rolle von CD44 in der Tumorentstehung hängt auch vom Molekulargewicht seines wichtigsten Liganden Hyaluron ab. Interaktion mit hohem Molekulargewicht (>950 kDA) aktiviert vor allem die Signalwege, die für Tumorentstehung zuständig sind: PI3K, Akt und MAPK-Ras (Swain, Routray et al. 2017). CD44 unterstützt dabei die Zellproliferation, Migration und Invasion. Konträr dazu führt die Assoziation mit Hyaluron mit niedrigem

Molekulargewicht zu einer Blockade der von CD44-vermittelten onkogenen Signalwege und folglich zu Tumorsuppression (Misra, Heldin et al. 2011).

3. Rolle von CD in CSCs: CD44, speziell seine Isoform CD44v6, wird überwiegend in Krebs-Stammzellen in verschiedensten humanen Krebsformen exprimiert. Dabei wird ihm eine Auswirkung auf aggressives Tumorverhalten, Medikamentenresistenz und erhöhte Rezidivraten unterstellt (Swain, Routray et al. 2017). Mehrere mögliche Funktionsweisen wurden hierzu für CD44 vorgeschlagen, etwa eine Rolle in der Stammzellerhaltung (siehe Abbildung 5), Einleitung des Epithelialen-Mesenchymalen-Übergang-Prozesses (EMT) oder der Schutz vor freien Radikalen (Yan, Zuo et al. 2015).

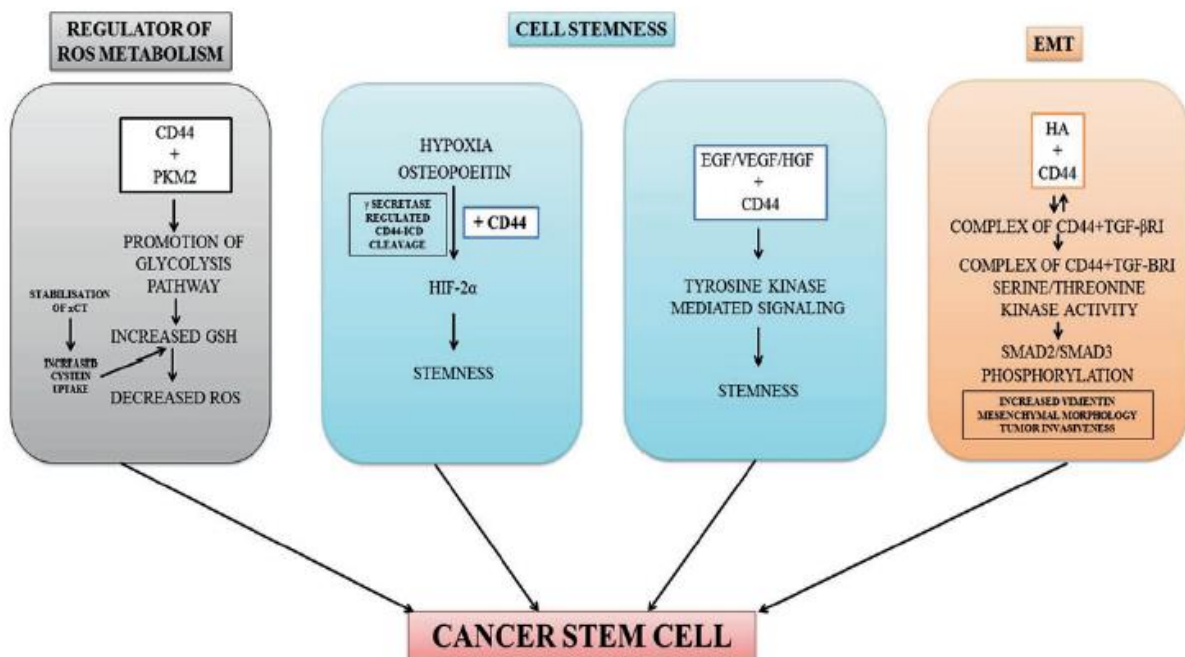


Abbildung 5: Mögliche Rolle von CD44 in Krebsstammzellen durch Erhalt der Stammfunktion (Wachstumsfaktor-vermittelter Kinaseweg und intramembranöse Spaltung), Induktion von EMT und Hemmung reaktiver Sauerstoffspezies (Aktivierung des antioxidativen Enzyms) (Swain, Routray et al. 2017)

Die Rolle der CD44-Expression in HNSCCs ist noch nicht vollständig geklärt. Wang et al. berichten etwa, dass eine hohe CD44-Expression mit vermehrter Lymphknotenmetastasierung und erhöhtem T-Stadium einhergehen. Ebenso werden einige CD44-Isoformen mit vermehrter Strahlenresistenz in Verbindung gebracht (Wang, Wreesmann et al. 2007). Andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass CD44 und seine Isoformen keinerlei Rolle in der HNSCC-Progression spielen (Herold-Mende, Seiter et al. 1996, van Hal, van Dongen et al. 1999). Dennoch konnte ein Modell aufgestellt werden,

wonach CD44 nach Interaktion mit Hyaluron einen multimolekularen Komplex mit EGFR und LARG (Leukemia-associated Rho-guanine) formt, wodurch zahlreiche nachfolgende Signalwege aktiviert werden. Wechselwirkungen mit Ras, RhoA, Rhokinase und Phosphatidylinositol-3 Kinase können auftreten. Dies wiederum kann zu vermehrter Tumorprogression und Strahlenresistenz in HNSCCs führen (Wang and Bourguignon 2011).

2.3.2.2 Aldehyddehydrogenase-1 (ALDH1)

Neben CD44 existieren auch noch weitere Marker für Stammzellpopulationen. Unter diesen CSC-Markern sind für HNSCCs auch die Aldehyddehydrogenase-Isoenzyme gut erforscht. Die ALDH-Superfamilie besteht aus 19 Isoformen, welche physiologisch reaktive Aldehyde, die durch Alkohol, chemotherapeutische Bestandteile oder auch Lipid-Peroxidation gebildet werden, in ihre inaktive Form überführen (Ma and Allan 2011). ALDH1-positive CSCs finden sich sowohl in Primärtumoren aus der Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx, als auch in Lymphknotenmetastasen (Qian, Wagner et al. 2014). Diese Isoenzyme können intrazellulär Aldehyde oxidieren und die Oxidation von Retinol zu Retinsäure steuern. Retinsäure wiederum besitzt die Fähigkeit, in den Zellkern einzudringen und mittels Aktivierung von Heterodimeren die Transkriptionsaktivität von nachfolgenden Signalketten zu starten. So trägt Retinsäure unter anderem zum d bei (Yoshida 1992). ALDH-Aktivität wird aber auch benötigt, um eine niedrige Konzentration an Sauerstoffradikalen beizubehalten und so eine Apoptose der CSCs zu verhindern (siehe Abbildung 6) (Xu, Chai et al. 2015). Zudem wird die katalytische Aktivität des ALDH1-Enzyms als mitverantwortlich für die Resistenz von Vorläuferzellen gegen Chemotherapeutika betrachtet (Lindahl 1992). Viele Chemotherapeutika wie Cisplatin oder Erlotinib erzeugen ebenfalls oxidativen Stress und heben so den Level an verschiedenen Aldehyden, die durch Lipid-Peroxidation entstehen (Raha, Wilson et al. 2014). Sowohl in bestimmten Krebszellen, aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wurden erhöhte Level von oxidierten Makromolekülen nachgewiesen (Chen, Budas et al. 2008, Ma and Allan 2011). ALDH spielt für die weitere Metabolisierung dieser reaktiven Aldehyde sowie die Reduzierung des oxidativen Stresses in der Zelle eine entscheidende Rolle (Singh, Brocker et al. 2013). Bei der adenokarzinomatösen Form von Brustkrebs konnte so beispielsweise eine erhöhte ALDH1A1- und ALDH3A1-Aktivität bereits als Prädiktor für vermindertes Ansprechen auf eine Cyclophosphamid-Therapie nachgewiesen werden (Moreb, Mohuczky et al. 2007).

Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass selektive Inhibitoren der relevanten ALDH-Isoenzyme bei HNSCCs möglicherweise den Widerstand gegen Chemotherapeutika reduzieren und so die Krebszellen für eine verminderte Dosis an Chemotherapeutika sensibilisieren könnten (Kim, Shin et al. 2017). Mittels sogenannter ALDH-Inhibitoren (Aldis) konnten Khanna et al. für eine bestimmte Zelllinie bei Lungenkrebs (A549) zeigen, dass diese die Sensitivität der Zellen für Mafosfamid (einem Metaboliten von Cyclophosphamid)

signifikant erhöhen konnten. Es wird vermutet, dass diese Aldis die Überführung der Chemotherapeutika in ihre inaktive Form verhindern (Khanna, Chen et al. 2011).

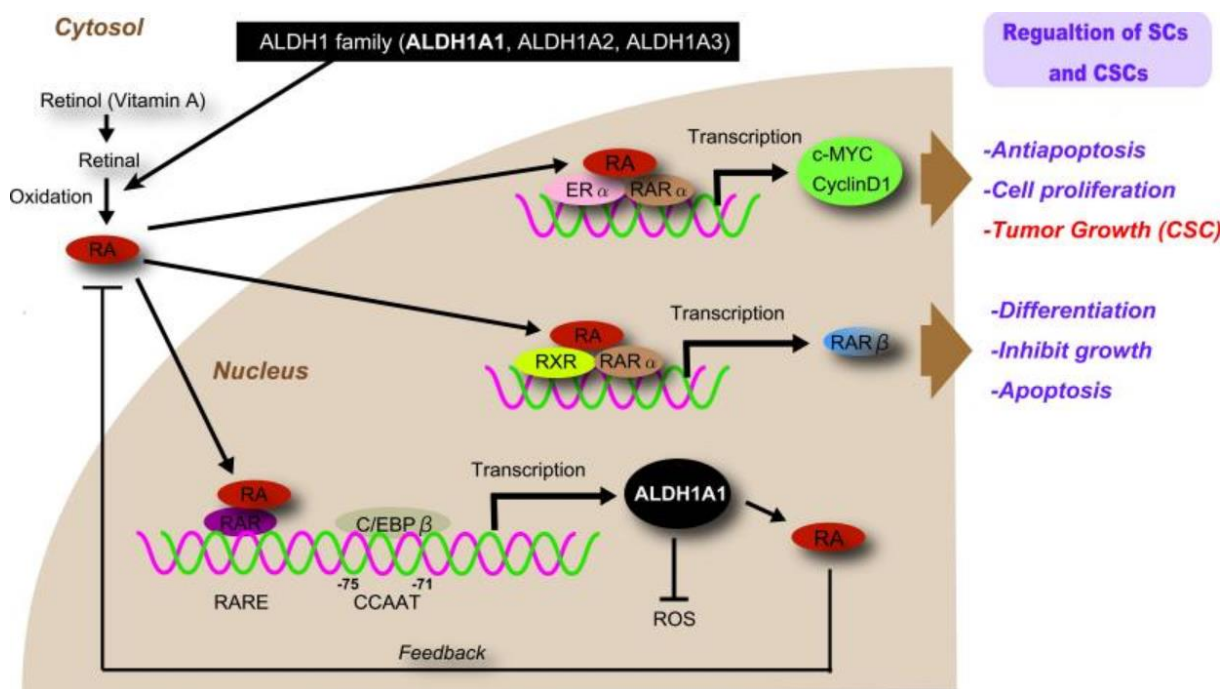


Abbildung 6: Steuerung und Funktion von ALDH1 in CSCs. Mehrere ALDH-Isoenzyme metabolisieren Retinsäure (RA) und führen so zu Selbsterneuerung, Differenzierung und Tumorwiderstand von SCs und CSCs (Xu, Chai et al. 2015)

Eine Arbeit, die in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie am Klinikum rechts der Isar, München durchgeführt wurde, konnte für eine große Kohorte den Zusammenhang zwischen hoher ALDH1-Expressionsrate in Lymphknoten und dem UICC Stadium IV ($P=0,044$), sowie T4-Stadium ($p=0,03$) demonstrieren. Aufgrund ihrer Daten schlägt die Arbeitsgruppe deshalb die ALDH1-Expression als möglichen Parameter für eine ungünstige Prognose vor (Gotz, Bissinger et al. 2018). Dies unterstreicht die Annahme, dass ALDH zu gesteigerter Tumorgenese beiträgt (Yoshida 1992). Im Rahmen dieser Arbeit wird ALDH1 stellvertretend für die ALDH-Familie vor allem hinsichtlich ihrer Rolle in Radio- und Chemoresistenz genauer untersucht.

2.3.3 Rolle des Immunsystems in der Krebsentstehung

Damit eine Anti-Krebs-Immunantwort zu einer wirksamen Abtötung von Krebszellen führen kann, muss eine Reihe von schrittweisen Ereignissen eingeleitet werden. Diese Schritte werden als Krebsimmunitätszyklus (Cancer Immunity Cycle, CIC) bezeichnet, welcher in Abbildung 7 dargestellt wird. Zusammengefasst läuft dieser Vorgang folgendermaßen ab:

1. Tumorzellen produzieren mutierte Antigene, die von dendritischen Zellen festgehalten werden.

2. Die dendritischen Zellen beladen T-Zellen mit Tumorantigen und stimulieren die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen.
3. Aktivierte T-Zellen wandern folglich zum Tumor und infiltrieren die Tumorumgebung.
4. Die aktivierten T-Zellen erkennen die Krebszellen und binden an diese.
5. Die gebundenen Effektor-T-Zellen setzen Zytotoxine frei, die in ihren Zielkrebszellen Apoptose induzieren (Chen and Mellman 2013).

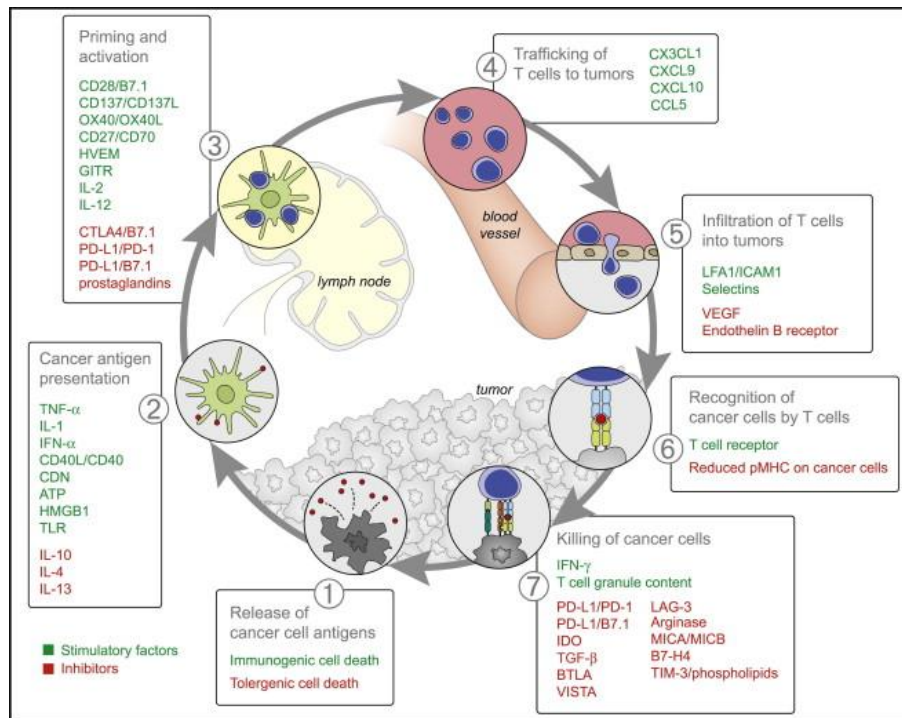


Abbildung 7: Der Krebs-Immun Zyklus (Chen and Mellman 2013)

Das Abtöten der Krebszellen wiederum lässt einige zusätzliche tumor-assoziierte Antigene frei (Schritt 1 wird wiederholt), die dafür sorgen, dass die Gesamtantwort des Zyklus noch breiter und effektiver wird. Bei Krebspatienten funktioniert dieser CIC-Zyklus nicht optimal. Oft werden Tumor-Antigene nicht erkannt oder dendritische Zellen und T-Zellen erkennen Antigene als „eigen“ anstatt als „fremd“ an. Dies führt dazu, dass eher T-regulatorische Zellreaktionen anstatt Effektorantworten erzeugt werden. Somit können T-Zellen nicht richtig auf Tumore wirken bzw. daran gehindert werden, dass sie den Tumor infiltrieren. Ebenso ist es möglich, dass Faktoren in der Tumormikroumgebung die eben produzierten Effektorzellen unterdrücken (Motz and Coukos 2013).

Jeder Schritt im Krebs-Immun-Zyklus erfordert die exakte Koordination von zahlreichen Faktoren, die sowohl stimulierender als auch inhibierender Natur sind. Stimulierende Faktoren (grün dargestellt) fördern die Immunität, wohingegen Inhibitoren (rot dargestellt) den Prozess überwachen, die Immunaktivität reduzieren und sogar Autoimmunität verhindern.

Immun-Checkpoint-Proteine wie etwa CTLA4 (Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen) können die Entwicklung einer aktiven Immunantwort verhindern, indem sie primär auf dem Level der T-Zell-Entwicklung und Proliferation arbeiten (Schritt 3). Davon abzugrenzen sind immunostatische Faktoren wie etwa PD-L1, welche ihre inhibierende Funktion primär darin ausüben, dass sie aktive Immunantworten im Tumorbett „modulieren“ (Schritt 7) (Chen and Mellman 2013). Weitere Beispiele solcher Faktoren und ihre Angriffspunkte im CIC-Zyklus sind in Abbildung 7 zusammengefasst.

2.3.3.1 PD-1/PD-L1

Der PD-1-Rezeptor (Programmed Cell Death Receptor 1, CD279) wird auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen exprimiert. Dessen Liganden PD-L1 (CD274) und PD-L2 (CD273) sind für gewöhnlich auf der Oberfläche von dendritischen Zellen oder Makrophagen exprimiert (siehe Abbildung 8) (Freeman, Long et al. 2000). Wie oben bereits beschrieben, zählen PD-1 und seine Liganden zur Gruppe der Immuno-Checkpoint-Inhibitoren, welche die Entwicklung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort unterbinden können. Die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 stellt sicher, dass das Immunsystem nur in einem bestimmten geforderten Zeitraum aktiviert ist. So wird beispielsweise verhindert, dass es zu chronischen Autoimmun-Entzündungen kommt. Unter normalen Bedingungen erfolgt der oben beschriebene CIC-Zyklus, eine Art Antikrebs-Immunantwort, in Form von Apoptose (Chen and Mellman 2013).

Tumorzellen können an diese Antitumor-Aktivität adaptieren, indem sie den PD-1/PD-L1 Signalweg nutzen. Normalerweise ist PD-L1 auf Tumorzellen oder Tumoren in der Mikroumgebung des Tumors überexprimiert (Pardoll 2012). Die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 reguliert die Immunantwort negativ. Es kommt zu einer Senkung der Zytokinproduktion und Induktion der Apoptose von T-Lymphozyten. Die Hochregulierung von PD-L1 ermöglicht es den Tumorzellen dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen, indem sie funktionell die Immunkontrolle der T-Zellen hemmt. Durch gezieltes Blocken dieser Wechselwirkung kann die T-Zell-Antwort verstärkt und klinische Anti-Tumor-Aktivität vermittelt werden (Riley 2009, Gordon, Maute et al. 2017). Hohe PD-L1-Immunexpressionen werden in 46% - 100% der Fälle berichtet (Zandberg and Strome 2014).

In den letzten Jahren wurden mehrere medikamentöse Immuno-Checkpoint-Inhibitoren entwickelt. Gerade in fortgeschrittenen, bereits metastasierten Krankheitsstadien sollen diese eine Verlängerung der Lebenszeit bei gleichzeitiger Verbesserung der Lebensqualität bringen (Huang and Shi 2019). Die beiden vielversprechendsten Inhibitoren sind Nivolumab und Pembrolizumab, die beide im Jahr 2016 zugelassen wurden. Seitdem wird ihre Rolle als Einzelmedikament, aber auch in Kombination mit den herkömmlichen Behandlungsmethoden intensiv untersucht. Nivolumab ist ein PD-1 Antikörper, der selektiv die PD-1/PD-L1 Achse hemmen soll (Forster and Devlin 2018). Erste Studien in HNSCC konnten hier signifikante Verbesserungen im Überleben (OS, DFS) und ein 30% niedrigeres krankheitsbezogenes

Todesrisiko (HR: 0,70; 95% CI: 0,51 bis 0,96) zeigen. Für andere Tumor-Entitäten sind bereits mehr Daten vorhanden, wie für das humane Melanom. Auch hier zeigt sich ein deutlicher Benefit für die Patienten in späten Krebs-Stadien (Topalian, Sznol et al. 2014). Pembrolizumab, ein weiterer PD-1 Antikörper, wurde ebenfalls eingehend als Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit Rezidiven bzw. Metastasen untersucht. Auch hier konnte das OS und DFS merklich gesteigert werden. Hinsichtlich der Toxizität wurde die Behandlung ebenfalls gut vertragen. Lediglich bei 9% aller Patienten wurde ein Toxizitäts-Grad von 3 oder 4 berichtet (Chow, Haddad et al. 2016).

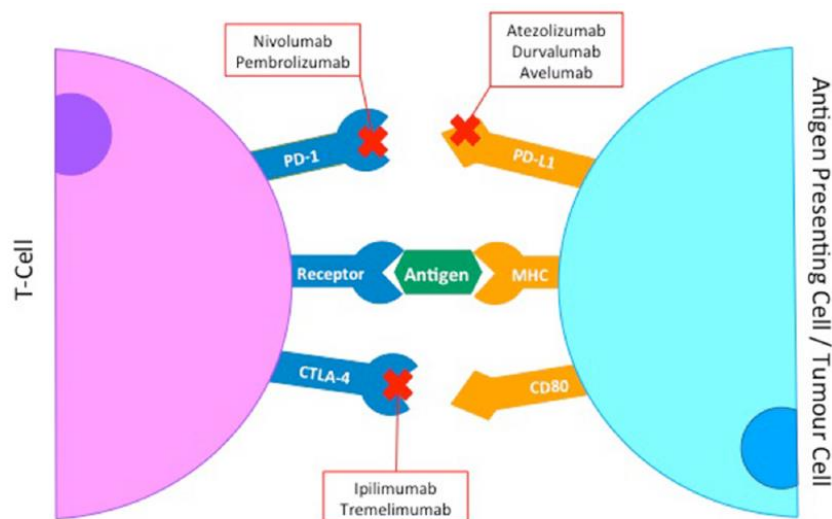


Abbildung 8: Monoklonale Antikörper gegen wichtige inhibitorische Immuno-Checkpoints. PD-L1, das auf den Tumorzellen exprimiert wird, bindet an die PD-1 Rezeptoren auf den aktivierten T-Zellen und führt so zu deren Inhibition. Diese deaktivierten T-Zellen verbleiben im inaktiven Zustand in der Tumormikroumgebung (Forster and Devlin 2018)

Neben Interesse an der Kombination von Immun-Checkpoint-Inhibitoren mit anderen neueren Therapeutika, gibt es auch ein Bestreben, diese mit Radio- bzw. Chemotherapie zu kombinieren. Beide dieser herkömmlichen Behandlungsmethoden verändern die Tumormikroumgebung und induzieren immun-vermittelten Zelltod (Forster and Devlin 2018). Arbeiten wie die von Deng et al. konnten in präklinischen Versuchen anhand von Mäusezellen eine Überexpression von PD-L1 nach primärer Radiochemotherapie (RCTx) nachweisen (Deng, Liang et al. 2014). Im Falle des nicht operablen, fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinoms konnte in einer groß angelegten Phase III PACIFIC-Studie eine merkliche Verbesserung bei Therapieansprechen, DFS und mittlerer Zeit bis zum Todeseintritt bei adjuvanter Anwendung von Durvalumab (ein IgG1 PD-1/PD-L1-Inhibitor) nach primärer RCTx festgestellt werden (Antonia, Villegas et al. 2017). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass

eine hohe Anzahl von CD3+ und CD8+ Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) positiv mit dem klinischen Outcome nach RCTx in HNSCCs korreliert (Balermipas, Michel et al. 2014). Wie in der Einleitung im Kapitel 2 beschrieben, wird auch der Tyrosinkinaseinhibitor Cetuximab in Kombination mit Strahlentherapie in lokal fortgeschrittenen HNSCCs eingesetzt. Eine Studie konnte dazu bereits nachweisen, dass Cetuximab-aktivierte natürliche Killerzellen eine Interaktion mit dendritischen Zellen eingehen. Dies wiederum führte zur Aktivierung von Tumor-Antigenen und Zytokinfreisetzung. Somit wurde vorgeschlagen, dass die Identifikation von EGFR-spezifischen T-Zellen in mit Cetuximab behandelten HNSCC-Patienten als Biomarker für Therapieansprechen genutzt werden könnte. Darüber hinaus wird vermutet, dass dies auch eine Auswirkung auf die vermehrte Expression von Checkpoint-Inhibitoren wie PD-1, TILs, sowie Cytotoxic T-Lymphocyteassociated Protein 4 (CTLA-4) haben könnte (Srivastava, Lee et al. 2013, Sridharan, Margalit et al. 2016). Die genaue molekulare Verbindung konnte bislang allerdings noch nicht nachgewiesen werden.

Dennoch zeigen die genannten Ansätze, dass eine mögliche Kombination von Biomarkern eine Risiko- bzw. Therapie-Selektion von HNSCC-Patienten für eine Immuntherapie ermöglichen könnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen Aufschlüsse über mögliche Zusammenhänge der gewählten Biomarker gefunden werden, die eine erste Einordnung in ein klinisches Setting ermöglichen.

2.3.4 Humanes Papilloma Virus

Neben übermäßigem Alkohol- und Tabakkonsum gilt eine Infektion mit dem Humanen Papilloma Virus als gesicherter Risikofaktor bei der Entstehung von HNSCCs. HPV ist Mitglied der Papillomaviridae-Familie, welches als unbekapseltes Virus bestehend aus sechs bis acht Genen mit zirkulärer Doppelstrang-DNA beschrieben wird (Mallen-St Clair, Alani et al. 2016). Bei jedem neudiagnostizierten HNSCC sollte ein HPV-Status erhoben werden, um eine Einordnung in bestimmte Risikopopulationen zu ermöglichen. Dazu gibt es mehrere Möglichkeiten:

1. Indirekt mittels p16 Immunhistochemie als Surrogatparameter für HPV,
2. Fluorescence in situ Hybridization (FISH, lokalisieren einer bestimmten DNA-Sequenz auf einem Chromosom),
3. genetische Analysen des HPV-Gens,
4. sowie Flüssig-Biopsien (Liquid Biopsies, eine Art genetische Untersuchung des Tumors auf Basis von im peripheren Blut zirkulierendem genetischen Material) (Venuti and Paolini 2012).

Es bestehen einige molekulargenetische Erklärungspunkte für die Rolle von HPV bei HNSCCs. Das Tumorsuppressorgen p53 liegt bei HPV-assoziierten HNSCCs in seiner Wildtypform vor und auch die Mutationsrate ist wesentlich geringer als bei nicht-HPV-assoziierten Tumoren. HPV 16 bzw. seine viralen Onkogene HPV E6 und HPV E7 greifen

entscheidend in die Zellzykluskontrolle ein. HPV E6 inaktiviert p53, was folglich zu einer Fehlfunktion von p53 führt. Zudem findet in diesen Tumoren auch keine p16-Deletion mehr statt. Weil HPV E7 zudem das zweite Tumorsuppressorgen Retinoblastom (Rb) inaktiviert, welches wiederum den Zellzyklus in Wirtszellen reguliert, wird p16 somit überexprimiert (Perrone, Suardi et al. 2006). Die Folge sind unkontrolliertes Zellwachstum und DNA-Schädigung, welche in weiterer Folge zu malignen Zellen führen (Kobayashi, Hisamatsu et al. 2018). Experimentell konnten die Einflüsse von HPV E6 und E7 eindeutig nachgewiesen werden, sowie durch Blockade dieser Onkoproteine eine geordnete Apoptose der entarteten Zellen ermöglicht werden (Smeets, van der Plas et al. 2011). Einen genauen Ablauf der molekularpathologisch beteiligten Enzyme zeigt Abbildung 9.

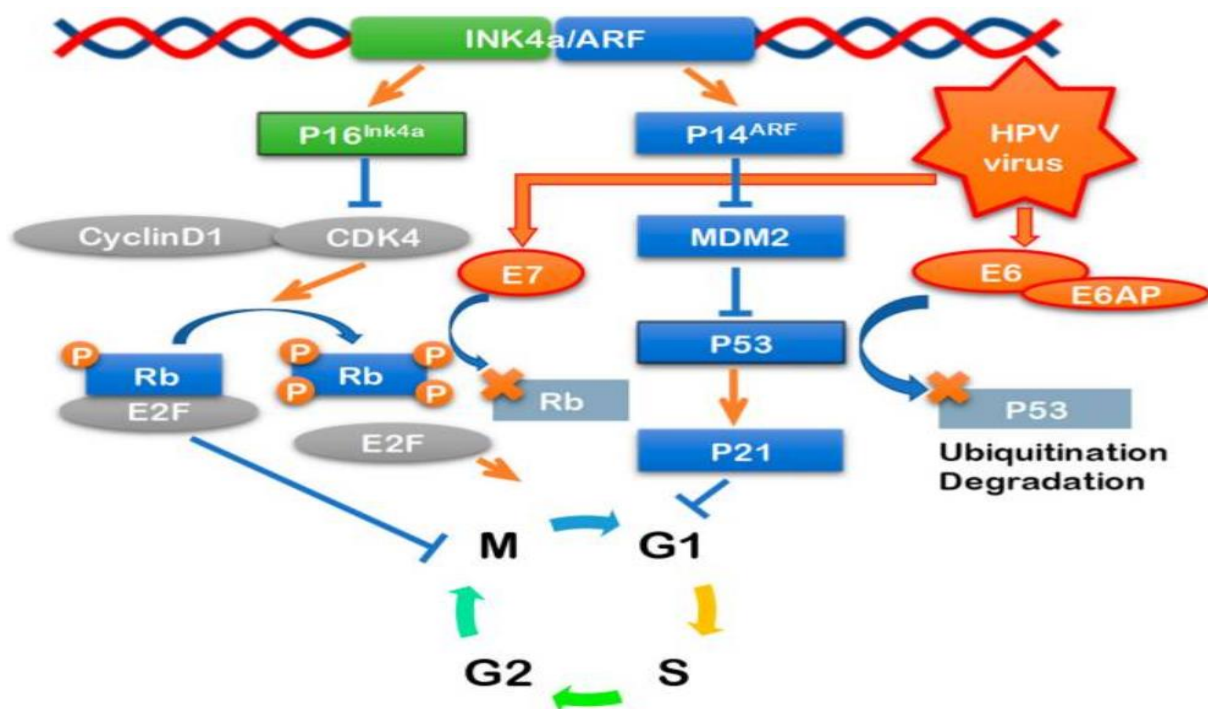


Abbildung 9: Signalwege der high-risk HPV Onkogene. E6 inaktiviert den durch den Tumorsuppressor p53 gesteuerten DNA-Schädigungs- und Apoptose-Signalweg. E7 inaktiviert die durch den Tumorsuppressor Rb gesteuerte Zellzyklusregulation (Kobayashi, Hisamatsu et al. 2018)

Die genaue Rolle der HPV-Infektion unter Strahlentherapie wurde bereits eingehend untersucht. Zu verstehen, warum HPV-assoziierte Tumore besser auf Strahlentherapie reagieren, ist ein wesentlicher Punkt in der Therapieplanung von HNSCCs. Bislang konnte gezeigt werden, dass HPV-assoziierte HNSCCs teilweise die Fähigkeit besitzen, durch ionisierende Strahlung entstandene DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren. Ebenso konnte in derselben Arbeit eine Hochregulierung der für Basenexzision und Einzelstrang-DNA-Reparatur verantwortlichen Moleküle beobachtet werden (Nickson, Moori et al. 2017). Andere Studien wiederum fanden veränderte DNA-Reparatur-Mechanismen sowie eine modifizierte Regulierung des Zellzyklus in HPV-assoziierten HNSCCs (bspw. durch den Abbau der

Acetyltransferase Tip60, welche ebenfalls für die Aktivierung der Reparatur bei DNA-Schädigung verantwortlich ist (siehe Abbildung 10) (Jha, Vande Pol et al. 2010). Auch nach Bestrahlung überleben in der Tumormikroumgebung von HPV-assoziierten HNSCCs mehr Immunzellen und pro-inflammatorische Zytokine, welche ihrerseits zu einer besseren Tumoreradikation beitragen können (Gottgens, Ostheimer et al. 2018).

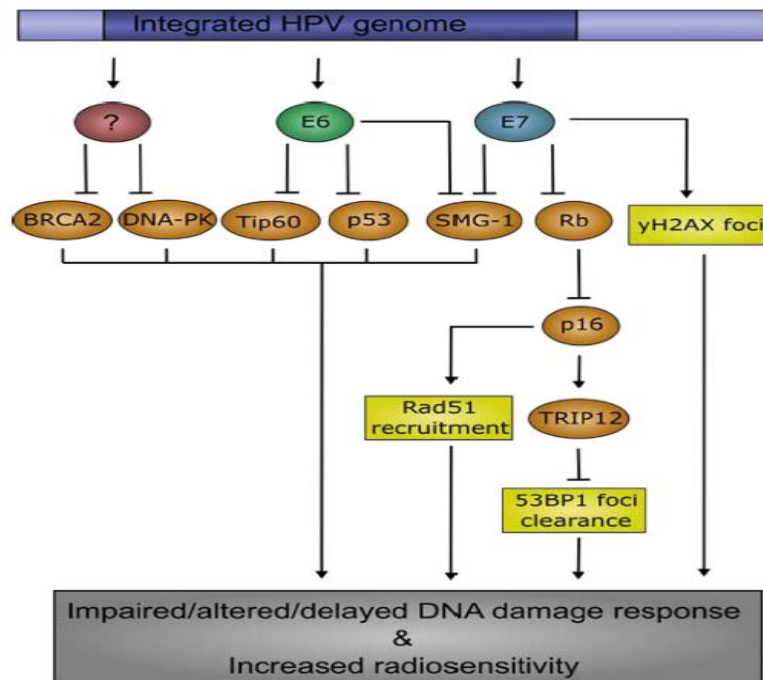


Abbildung 10: Mechanismen, die zur erhöhten Strahlensensitivität bei HPV-positiven HNSCCs beitragen können: E6 und E7, sowie möglicherweise bislang unbeschriebene Prozesse unterdrücken für die DNA-Reparatur verantwortliche Moleküle wie SMG-1, p53 und BRCA2. Bestrahlung von HPV-positiven Tumoren erzeugt höhere Expressionen von yH2AX und RAD51 Foki im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren. Zusätzlich glaubt man bisher durch verminderte Expression des Enzymes 53BP1, dass HPV-positive HNSCCs beeinträchtigte Doppelstrang-Reparaturmechanismen aufweisen, was zu ihrer intrinsischen Strahlensensitivität führen kann (Gottgens, Ostheimer et al. 2018)

Tumorhypoxie scheint ebenso eine Rolle in der Entstehung von HNSCCs zu spielen und wird als negativ prognostischer Faktor angesehen (Hong, Zhang et al. 2013). Zwar weisen HPV-positive wie negative HNSCCs gleiche Verteilungsraten an Hypoxie innerhalb des Tumors auf, jedoch scheint es in HPV-positiven Zellen durch Bestrahlung vermehrt zu einem Zellzyklusarrest und Abnahme der proliferierenden Zellen zu kommen. Bislang konnte allerdings noch kein in vivo Nutzen der Hypoxie-Kontrolle bei HPV-assoziierte HNSCC-Zelllinien gefunden werden (Sorensen, Busk et al. 2014). Sämtliche dieser Ergebnisse belegen, dass HPV-assoziierte HNSCCs als eigene Entität innerhalb der HNSCCs angesehen werden und folglich auch unterschiedlich therapiert werden müssen. Unsere Studie soll mittels Einteilung in spezielle Subgruppen von Marker-Kombinationen eine mögliche Risikostratifizierung als weiteren Schritt in der HPV-assoziierten HNSCC-Forschung darstellen.

2.4 Problemstellung

HNSCCs sind zurzeit die sechsthäufigste Tumor-Entität weltweit. Trotz verbesserter Behandlungsmethoden stagniert das mittlere 5-Jahres-Überleben der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom in dieser Körperregion bei ca. 50%. Ebenfalls etwa 50% der Patienten ab Tumorstadium III entwickeln ein Lokalrezidiv in den ersten zwei Jahren ab Erstbehandlung (Bose, Brockton et al. 2013). Lediglich bei 50% aller HNSCC-Patienten erfolgt eine vollständige Heilung (Goerner, Seiwert et al. 2010). All diese Zahlen verdeutlichen, welches großes Interesse darin besteht, bessere prognostische und therapeutische Marker für die individuelle Therapieplanung für Patienten mit HNSCC zu finden. Bislang galten Risikofaktoren wie etwa Alkohol- oder Nikotinkonsum sowie klassische Staging-Parameter wie die TNM-Klassifikation als zuverlässigste Prognosemarker. Bis vor wenigen Jahren waren Bestrahlung sowie chirurgische Entfernung der Tumore die Standardbehandlungsformen bei HNSCC (Argiris, Karamouzis et al. 2008). In den letzten Jahren gelang es allerdings immer besser, die zugrundeliegenden molekularen pathologischen Vorgänge bei Tumoren zu verstehen. Obwohl im Bereich der HNSCC noch Nachholbedarf besteht, gewinnt die sogenannte Target-Therapie immer mehr an Bedeutung.

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Basierend auf den zahlreichen Vorarbeiten im Bereich der Target-Therapie soll es Ziel dieser Arbeit sein, mögliche Angriffspunkte auf molekularer Ebene hinsichtlich ihrer Aussagekraft als prognostische Marker zu prüfen. Da sich bislang kein Einzelmarker in Bezug auf die Prognose eindeutig durchsetzen konnte, ist unsere Hypothese, dass möglicherweise Markerkombinationen die Einordnung in gewisse Risikoprofile zulassen könnten. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden sieben Schlüsselenzyme spezieller Signaltransduktionswege einerseits sowie der Zellzyklusregulation andererseits ausgewählt und anhand von immunhistochemischen Färbungen ausgewertet.

Zudem gilt die Radiotherapie nach wie vor als eine der Grundbausteine in der Tumorthherapie (Argiris, Karamouzis et al. 2008). Zahlreiche Untersuchungen wurden in den letzten Jahren hinsichtlich Radiotherapie und ihrer Auswirkungen auf zellulärer Ebene durchgeführt. Für einige Krebsformen konnte so eine strahleninduzierte Migration der Krebszellen nachgewiesen werden. Dies führte etwa bei Glioblastomen zu einer vermehrten Rezidivrate (Wild-Bode, Weller et al. 2001). Ähnliche Arbeiten in diesem Themenfeld wurden zudem von unserer Arbeitsgruppe unternommen (Pickhard, Margraf et al. 2011, Schuettler, Piontek et al. 2015). Eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit beinhaltet die bereits gefundenen theoretischen Daten anhand eines Patienten-Kollektives klinisch zu untermauern, welches in den Jahren 2008 bis 2014 aufgrund eines diagnostiziertem HNSCC am Klinikum rechts der Isar in München behandelt wurde. Neben den Markern pAkt (Proteinkinase B) und Survivin,

welche bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Pickhard, Grober et al. 2014) als vielversprechende Marker hinsichtlich strahleninduzierter Migration vorgeschlagen wurden, wurde unsere Auswertung unter anderem auch hinsichtlich Krebsstammzellmarker wie CD44 bzw. ALDH1 sowie immunmodulatorische Marker, wie etwa PD-1 sowie dessen Ligand PD-L1 erweitert. Ein zweites Ziel dieser Arbeit ist es, diese Marker mit Daten aus der Strahlentherapie zu korrelieren und mögliche Aussagen etwa bezüglich Migrationsverhalten, Langzeitüberleben, Krankheitsverlauf oder Rezidivrate der einzelnen Patienten zu treffen. Dies soll als Grundstein für künftige individuelle Therapie- und Prognoseplanung dienen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

In dieser Arbeit wurden folgende Materialien zur Erstellung der immunhistochemischen Präparate und in weiterer Folge zur Auswertung der resultierenden Ergebnisse verwendet:

1. Primärantikörper
2. Chemikalien (Reagenzien und Puffer)
3. Geräte
4. Verbrauchsmaterialien
5. Softwareprogramme

3.1.1 Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Positiv-Kontrolle	Hersteller
P16	1:200	Zervix-Karzinom	US Biological; Salem, MA, USA
pAKT Ser473	1:20	Mamma-Karzinom	Cell Signaling Technology, Inc.; MA, USA
HIF1 α	1:100	Mamma-Karzinom	Abcam; Cambridge, MA, USA
Survivin	1:100	Tonsille-Milz-Thymus-Uterus	Dako Deutschland GmbH; Hamburg, DE
CD44	1:2500	Tonsille	ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, USA
ALDH1	1:800	Ovarial-Karzinom	GeneTex; Irvine, CA, USA
PD-1	Keine	Tonsille	Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, USA
PD-L1	Keine	Tonsille	Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, USA

Tabelle 7: Verwendete Antikörper sowie Positivkontrolle

3.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Wasserstoffperoxid 30% Ethanol 96% Isopropanol p.a. Tris Base Natriumchlorid Salzsäure Natriumhydroxid EDTA-Puffer Citrat-Puffer Roti®-Histokitt II	Carl Roth GmbH u. Co KG; Karlsruhe, DE
Xylol	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG; Stuttgart, DE
Dako REAL Antibody Diluent Goat Serum (Normal) REAL™ Detection System Peroxidase/DAB+	Dako GmbH; Hamburg, DE
Saures Hämalaun nach Mayer Hämatoxylin Bläuungsreagenz	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, TU München, DE
Citrogensäure Monohydrat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, DE
Pertex Eindeckmedium	Medite Medizintechnik GmbH; Burgdorf, DE
Demineralisiertes Wasser	SAV Liquid Production GmbH; Flintsbach am Inn, DE

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien (Reagenzien und Puffer)

3.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Färbeautomat BenchMark GX	Roche – Ventana, Basel, CH
Mikrotom Microm HM355S	Microm International GmbH, Walldorf, DE
Wasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel, DE
Kühlplatte Paraffin Streckbad TFB 35 Objektträgerstrecktisch OTS 40	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf, DE
Brutschrank HeraCell 150i CO2 Inkubator	Thermo Scientific. Waltham, MA, USA
Leica Mikroskop DMI6000 B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Leica Mikroskopkamera DFC425 C	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE

Tabelle 9: Verwendete Geräte

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Mikrotomklingen Blade S35	Novoglas Labortechnik, Bern CH
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific. Waltham, MA, USA
Deckgläser 24x60 mm	Thermo Scientific. Waltham, MA, USA
Drucketiketten	Roche – Ventana Mannheim, DE
Antikörperdispenser	Roche – Ventana Mannheim, DE
Objektträger Kasten	NeoLab Migge GmbH Heidelberg, DE

Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.1.5 Softwareprogramme

Softwareprogramme	Hersteller
Microsoft® Word 1810	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft® Excel 1810	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
IBM® SPSS® Statistics Version 25	IBM GmbH, Ehningen, DE
Adobe Photoshop Version 22	Adobe System Inc., San Jose, CA, USA
Leica Application Suite LAS V3.8	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
ECLIPSE Version 13.0	Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA
Tomotherapy Planning Station Version 4.2.3	Accuray, Sunnyvale, CA, USA

Tabelle 11: Verwendete Softwareprogramme

3.2 Methoden

3.2.1 Studienkollektiv

Die vorliegende Studie beinhaltet insgesamt 121 Patienten, die von Juli 2007 bis Juli 2017 aufgrund eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf- und Halsbereiches am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München in der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde behandelt und in diesem Zeitraum von uns beobachtet wurden. Von den 121 Patienten wurden drei Patienten bei Behandlungsbeginn aufgrund des fortgeschrittenen Tumorstadiums als inoperabel für die Biopsiegewinnung angesehen und somit vollständig aus der Betrachtung herausgenommen. Somit erhielten die verbliebenen 118 Patienten eine primäre Strahlentherapie über durchschnittlich 16,4 Wochen, in der Regel bis hin zu einer Gesamtstrahlendosis von 70 Gy. Von diesen 118 Patienten erlitten im durchschnittlichen zehnjährigen Beobachtungszeitraum 30 Patienten (25,4%) ein Rezidiv des Primärtumors. Für sie wurden zusätzlich Volumengröße der Rezidive und weitere Daten aus der Strahlentherapie ermittelt. Folgende klinische und histologische Daten der Patienten wurden aus den Aufzeichnungen der einzelnen Abteilungen des Klinikums rechts der Isar entnommen und anonymisiert. Da sämtliche Patienten des Studienkollektives für die vorliegende Arbeit in einem Zeitraum von 2007 bis 2017 in die medizinische Datenbank des Klinikums rechts der Isar aufgenommen wurden, musste für die Beurteilung die 7. Auflage des Buches „TNM Klassifikation maligner Tumore“ aus dem Jahr 2010 (Wittekind 2010) herangezogen werden, obwohl zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit bereits eine 8. Auflage erschienen ist (Wittekind 2017). Neue Beurteilungskriterien, wie etwa die Tumoreindringtiefe, wurden in der alten Klassifikation noch nicht berücksichtigt und somit auch nicht von uns erhoben. Für diese Studie besteht zudem ein Ethikvotum des Klinikums rechts der Isar mit positivem Bescheid unter der Nummer 1420/05.

Klinische Parameter	Beschreibung
Geschlecht	Männlich oder weiblich
Alter	Patienten sind zwischen 50 und 85 Jahre alt
Tumorspezifische Daten	
Diagnose - Lokalisation	Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx, Nasopharynx, Nasennebenhöhle sowie Kombinationen
T	T1 bis T4b
N	N0 bis N3
M	M0, M1
G	G1 bis G4

Stadium	Stadium 1 bis 4c
Entität	PE-CA ohne nähere Angabe; nichtverhornendes PE-CA; verhornendes PE-CA; Adenosquamöses-CA; undifferenziertes PE-CA; lymphoepitheliales CA; Carcinoma in situ f. PE-CA; basaloides PE-CA; kleinzelliges PE-CA
Operations-Datum	Zwischen Juni 2008 und März 2014
Ende Strahlentherapie	Zwischen September 2008 und Juni 2014
Gesamtdosis Strahlentherapie	Gemessen in Gray (Burtness, Manola et al.) entspricht Joule/Kilogramm
Follow-Up-Daten	
Datum des letzten Follow-Up	Zeitpunkt, an dem entweder Tod, Rezidiv oder Ende der Beobachtungszeit eingetreten ist
Lokal-Rezidiv	Patient hat Lokal-Rezidiv ja/nein
Lokal-Rezidiv-Datum	Datum des Lokal-Rezidives, sofern entwickelt
Tod	Patient verstorben ja/nein
Todes-Datum	Wenn Patient bereits verstorben
Todesursache	Tumorassoziiert oder Nicht-tumorassoziiert
Patientenbezogene Risikofaktoren	
Alkoholabusus	Ja/nein (mehr als zehn Jahre kein Alkohol wird als Nichttrinker gewertet)
Nikotinabusus	Ja/nein (mehr als zehn Jahre kein Nikotin wird als Nichtraucher gewertet)
Karnofsky-Index	Von 10 bis 100; Lebensqualitäts-Index für Krebspatienten
Errechnete Überlebensdaten	
Overall Survival (OS)	Zeitraum zwischen Operationsdatum und Last Follow-up (Tod/Ende des Beobachtungszeitraumes)
Disease Free Survival (DFS)	Für Patienten mit Rezidiv: Zeitraum zwischen Ende der RTx bis zum Rezidiv; Für P. ohne Rezidiv: Ende Beobachtungszeitraum oder Tod
Behandlungsdauer RTx	Zeitraum zwischen OP und Ende RTx

Tabelle 12: Studienrelevante klinische Parameter

3.2.2 Kollektiv zur Immunhistochemischen Analyse

Zur immunhistochemischen Untersuchung konnten im Rahmen dieser Studie die Gewebe von 100 Patienten berücksichtigt werden. Die Differenz zum gesamten Patientenkollektiv von 121 ergab sich durch zum Zeitpunkt der Probenerstellung teils bereits unzureichend zur Auswertung geeignetem Tumorgewebe auf den Gewebeblöcken. Das im Rahmen einer Probenentnahme (PE) bzw. primärer Operation entnommene Gewebe besteht aus Tumor- sowie angrenzendem Normalgewebe. Diese Gewebeproben wurden mittels Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (sogenanntes Formalin-Fixed Paraffin Embedded Tissue, FFPE Gewebe). Mittels spezieller immunhistochemischer Färbungen wurden die Gewebe anschließend auf die Expression folgender Antigene geprüft: P16, Akt, Hif1 α , Survivin, CD44, ALDH1, PD-1, PD-L1.

3.2.3 Immunhistochemie

3.2.3.1 Färbevorgang der Immunhistochemie

Zunächst wurden die FFPE Gewebeblöcke auf einer Kühlplatte für ca. 10 min. gekühlt. Mittels des Mikrotoms wurden anschließend daraus 1,5 μ m dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden anschließend im Wasserbad bei 43°C gestreckt und sofort auf einen Objektträger aufgezogen. Danach wurden die Proben für mindestens 12 Stunden im Brutschrank bei 38°C getrocknet. Daraufhin erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte durch drei Wiederholungen eines zehnmütigen Eintauchens der Schnitte in Xylol. Die anschließende Rehydrierung erfolgte durch zweifach wiederholtes Eintauchen der Schnitte in Isopropanol für jeweils fünf Minuten, sowie das nachfolgende Eintauchen der Schnitte für jeweils fünf Minuten jeweils in 96% Ethanol, dann in 70% Ethanol und abschließend zur Rehydrierung in destilliertes Wasser. Um eine ausreichende Renaturierung zu gewährleisten, wurden die Schnitte anschließend noch in Citrat-Puffer (pH 6,0) im Dampfkochtopf für 7 Minuten gekocht. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für 5 Minuten in TRIS-Puffer (pH 7,6) gewaschen. Alle Schritte sind notwendig, damit sämtliche Antigene für die immunhistochemische Färbung zugänglich werden und keine Eiweißrückstände übrigbleiben.

Nach Abschließen der oben beschriebenen Punkte, folgt der eigentliche Färbeprozess mittels eines Färbeautomaten von Ventana unter der Zugabe von verschiedenen Primärantikörpern nach der Streptavidin-Biotin-Methode (Mülhardt 2013):

1. Inkubation mit Wasserstoffperoxid.
2. Hinzufügen der spezifischen Primärantikörper in passender Verdünnung: Die primären Antikörper binden an die Antigen-Bindungsstellen.

3. Inkubation mit dem Detektionskit (bestehend aus biotinylierten Sekundär-Antikörper, dem Peroxidase-markierten (Strept)avidin als auch dem Chromogen Diaminobenzin (Hashibe, Brennan et al. 2007). Die sekundären biotinylierten Antikörper binden an den Fc-Teil der primären Antikörper. Das Peroxidase-markierte (Strept)avidin bindet an das Biotin der sekundären Antikörper. Das DAB dient der Visualisierung des Komplexes. Es wird durch die Peroxidase in ein braungefärbtes Endprodukt umgewandelt.
4. Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Bläuungsreagenz.

Anschließend erfolgte eine erneute Dehydrierung der Schnitte durch Eintauchen in eine aufsteigende Alkoholreihe von 70% Ethanol, 96% Ethanol und zweimaligem Eintauchen in Isopropanol. Schlussendlich erfolgt das Eindecken mittels Deckglases.

3.2.3.2 Auswertung der Immunhistochemie

Sämtliche histologischen Schnitte wurden durch zwei unabhängige Untersucher der Arbeitsgruppe „Molekulare Onkologie“ in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Klinikums rechts der Isar der TU München untersucht und ausgewertet. Die Auswertung der jeweiligen Markerexpressionen erfolgte semiquantitativ unter Berücksichtigung des Prozentsatzes an positiven Zellen, sowie der Färbeintensität in Anlehnung an den semiquantitativen immunreaktiven Score (Brizel, Dodge et al. 1999) nach Remmele et al. (Remmele and Schicketanz 1993). Beim ursprünglichem IRS werden Anzahl der positiv gefärbten Zellen (Percentage Points, PP) und Intensität der Färbung (Staining Intensity, SI) multipliziert und ergeben so einen Gesamt-Score. In dieser Arbeit wurde eine leichte Modifikation dieses Scores vorgenommen: Der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Zellen (PP) wurde hier mit der der Intensität der Färbung (SI) addiert (Pickhard, Grober et al. 2014).

Demzufolge kann dieser Score Werte zwischen minimal 0 und maximal 7 annehmen. Den schwächsten positiven Wert, den eine Färbung anhand dieses Scores annehmen kann, ist demzufolge 2. Für spätere Berechnungen wurde somit auch bei einem Wert von 2 der Cut-Off bezüglich negativer und positiver Expression gewählt, um die Erstellung eines dichotomen Ereignisses zu gewährleisten.

Für die Marker PD-1 und PD-L1 wurde jede Expression von $\geq 1\%$ als positiv gewertet. Als Grundlage diente der sogenannte Cologne-Score, von uns in einer modifizierten Form verwendet (Hirsch, McElhinny et al. 2017).

IRS = PP + SI			
PP		SI	
negativ	0	negativ	0
< 10 %	1	schwach positiv	1
10 % - 29 %	2	mittel positiv	2
30 % - 60 %	3	stark positiv	3
> 60%	4		

Tabelle 13: Immunreaktiver Score (Brizel, Dodge et al. 1999) zur Auswertung der membranständigen Markerexpression (modifiziert nach Remmele und Schicketanz, 1993)

3.2.4 Zellmigrationsanalyse

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bestand ein zweiter wesentlicher Teil dieser Arbeit darin, die Zellmigration bei Patienten mit Lokal-Rezidiv näher zu untersuchen. Die immunhistochemischen Markerexpressionen wurden hierfür mit bildgebenden Daten der Radiologie und Strahlentherapie, insbesondere den Bestrahlungsplänen, verglichen.

Hypothese: Es wurde angenommen, dass durch die Strahlentherapie eine Zellmigration aus dem bestrahlten Volumen heraus auftritt. In der Bildgebung (MRT oder CT) bedeutet dies, dass im Randbereich des mit hoher Dosis bestrahlten Volumens und außerhalb Tumorrezidive auftreten müssten.

Sämtliche Patienten des untersuchten Kollektivs erhielten initial eine Strahlentherapie. Die Bestrahlungsplanung erfolgte nach CT- und MRT-gestützter 3D-Bestrahlungsplanung mit den Bestrahlungsplanungssystemen ECLIPSE Version 13.0 (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA) für volumetrisch-modulierte Arc-Therapie (VMAT) und intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) sowie Tomotherapy Planning Station Version 4.2.3 (Accuray, Sunnyvale, CA, USA) für helikale Tomotherapie (HT).

Verordnet wurde dabei zumindest eine Gesamtdosis von 30 bis maximal 70 Gy. Die mediane Bestrahlungszeit aller Patienten lag bei 132 Tagen. Insgesamt wurde in die Studie 121 Patienten eingeschlossen. Davon erlitten 30 Patienten ein Lokalrezidiv. Die Rezidivbildgebung wurde mit der Bestrahlungsplanungsbildgebung (CT und MRT) sowie der initialen Bildgebung im Rahmen der Diagnostik der Tumorerkrankung im Bestrahlungsplanungssystem ECLIPSE fusioniert. Für 23 der 31 Rezidivpatienten konnte eine suffiziente Fusion der Bilddatensätze erzielt werden.

Anhand dieser Fusionsbilder wurden dann folgende Volumina ermittelt:

1. Volumen des Ursprungstumors (Gross Tumor Volume, GTV) [cm³]
2. Volumen des Rezidivs [cm³]

3. Volumens des Rezidivs, welches im geplanten Bestrahlungsbereich des Ursprungstumors lag, inklusive Sicherheitssaum für eventuelle Lageänderungen (Planned Target Volume, PTV) [cm³]
4. Volumen des Rezidivs, welches im Hochdosisbereich (Boost) des Ursprungstumors lag [cm³]

Der Überschneidungsbereich der Volumina muss jeweils in Prozent angegeben werden. Dabei ist der genaue Bezug zu beachten (z.B. % des Rezidivvolumen im initialen Tumorvolumen (GTV), % im jeweiligen PTV bzw. Boostvolumen)

Abbildung 12 veranschaulicht die ermessenen Volumina, aus denen in weiterer Folge Parameter errechnet wurden in einer Modell-Skizze. Abbildung 13 und 14 zeigen in Detailaufnahmen die Volumenbestimmung an den Feldgrenzen, bzw. außerhalb dieser („out of field“).

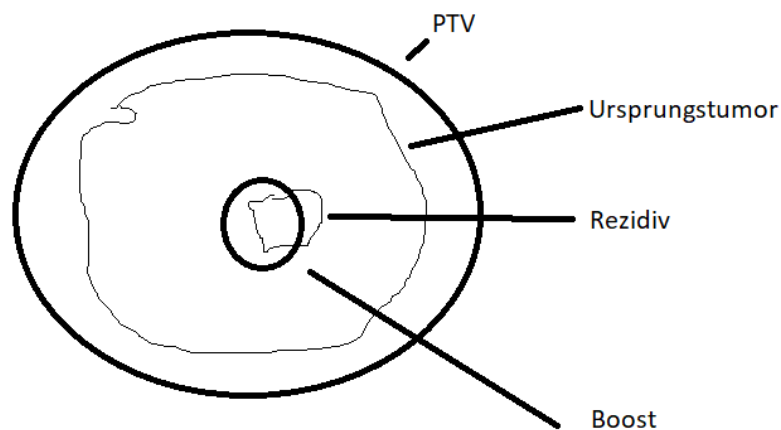


Abbildung 11: Schema der erhobenen Fusionsbilder aus Ursprungs-CT und Rezidiv-CT-Bildern

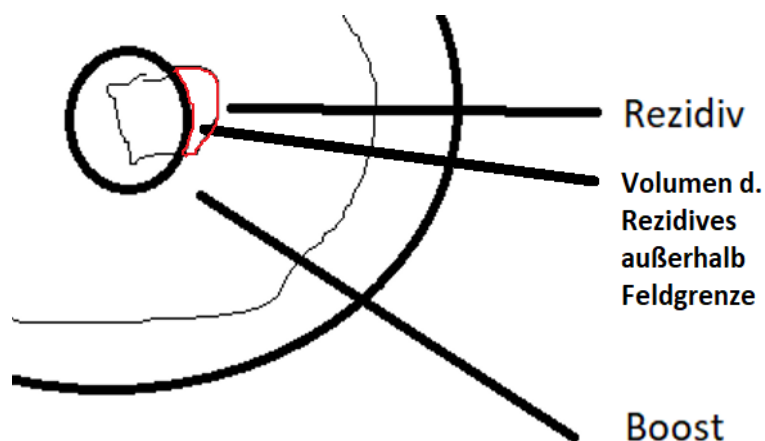


Abbildung 12: Detailaufnahme-Schema zur Rezidiv-Volumenbestimmung an den Feldgrenzen

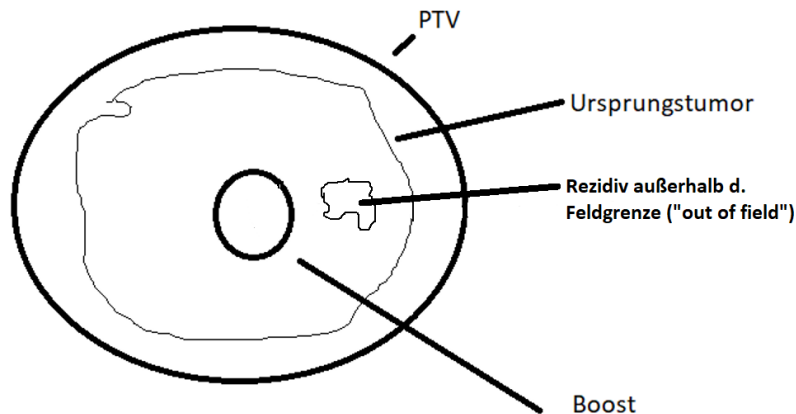


Abbildung 13: Detailaufnahme-Schema zur Rezidiv-Volumenbestimmung außerhalb der Feldgrenzen („out of field“)

Prozentual wurde daraus errechnet, welcher Anteil des Rezidiv-Volumens somit im PTV, bzw. im Boost der ursprünglichen Bestrahlung lag. Der Cut-Off zwischen Niedrig- und Hochdosisbereich bzw. für den Boost wurde bei jeweils 95% festgelegt und somit wiederum ein dichotomes Ereignis festgelegt. Danach wurden die errechneten Parameter mit den immunhistochemischen Expressionen (positiv versus negativ) der gewählten Marker mittels Vier-Felder-Tafeln korreliert und daraus möglich Zusammenhänge zwischen Markerexpression und strahleninduzierter Migration des Tumors abgeleitet.

3.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte anhand der Software IBM® SPSS® Statistics 25. Für alle statistischen Analysen wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt.

Für das gesamte Patientenkollektiv wurde zunächst eine rein deskriptive Statistik der unterschiedlichen Häufigkeiten der einzelnen erhobenen Parameter durchgeführt. Im zweiten Schritt wurde eine Analyse der Daten durchgeführt, welche sich aus der Immunhistochemie ergaben. Bei jenen Markern, bei denen mehrere intrazelluläre Lokalisationen gefärbt waren, wurde jene Lokalisation mit der höchsten Expression zur Betrachtung herangezogen. Mittels Spearman-Korrelation wurden folglich sämtliche Marker untereinander bivariat verglichen. Diese Ergebnisse wurden, sofern signifikant, mittels dreidimensionalen Streudiagrammen veranschaulicht. Ebenso wurden diese Marker mit patientenspezifischen Risikofaktoren (Raucherstatus, Alkohol-Konsum) verglichen.

Die weiteren klinischen Parameter (T-Stadium, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen, Grading, Tumorstadium und Rezidivrate), aber auch jene Daten, die aus der Strahlentherapie entnommen wurden, wurden mittels Kreuztabellen / Vier-Felder-Tafeln (Chi-Quadrat-Test bzw. für geringe Fallzahlen mittels exaktem Test nach Fisher) mit den Ergebnissen aus der Immunhistochemie verglichen. Um, wie in diesem Fall gefordert, zwei dichotome Ereignisse

miteinander vergleichen zu können, wurde für sämtliche Werte ein Cut-Off festgelegt, welcher die Grenze zwischen niedrigem und hohem Stadium bzw. im Fall der Marker zwischen niedriger und hoher Markerexpression festlegt. Im Fall der klinischen Parameter wurde so zumeist zwischen Anfangs- oder fortgeschrittenem Stadium unterschieden (bspw. T1 und T2 vs. T3 und T4). Für die Markerexpression wurde ein Cut-Off von 2 festgelegt. Damit galten alle Marker unabhängig von der Anzahl der gefärbten Zellen oder der Farbtintensität als positiv ($\text{Score} \geq 2$). Damit konnte einem der Hauptkritikpunkte an der immunhistochemischen Auswertung entgegengewirkt werden.

In einem weiteren Schritt wurden für die Marker Überlebensanalysen mittels Kaplan-Meier-Kurven und Log-Rank-Test durchgeführt. So konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen Markerexpression und OS bzw. DFS mittels Überlebenskurven dargestellt werden. Auch in diesem Fall wurde für die Marker ebenfalls ein Cut-Off von 2 ausgewählt.

Abschließend wurde eine binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob jene Variablen, die im Chi-Quadrat Test einen signifikanten Zusammenhang zeigten, tatsächlich als unabhängige Vorhersageparameter für das Eintreten eines definierten Ereignisses geeignet sind. Die gewählte Analyse sollte zudem zeigen, wie stark die Variablen die Wahrscheinlichkeit, dass dieses definierte Ereignis eintritt, beeinflussen.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Kollektivs

Charakteristika	Daten
Patienten	
Anzahl	121 (100%)
Lokal-Rezidive	30 (25,4%)
OP / Radiochemotherapie	118 (97,5%)
Initial Inoperabel / verweigert	3 (2,5%)
Geschlecht	
Männlich	94 (77,7%)
Weiblich	27 (22,3%)
Alter	
Mittleres Alter	69,05 Jahre
Altersverteilung	50-85 Jahre
Medianes Gesamtüberleben	3,2 Jahre
Medianes Krankheitsfreies Überleben	2,9 Jahre
Medianes Alter bei Diagnosestellung	62,1 Jahre
Nikotinkonsum	
Raucher	43 (35,5%)
Nichtraucher	76 (62,8%)
Keine Angaben	2 (1,7%)
Alkoholkonsum	
Regelmäßig	50 (41,3%)
Kein Konsum	68 (56,2%)
Keine Angaben	1 (0,8%)

pN-Klassifikation

pN0	19 (15,7%)
pN1	7 (5,8%)
pN2a	3 (2,5%)
pN2b	46 (38,0%)
pN2c	42 (34,7%)
pN3	1 (0,8%)
pN2 Gesamt	91 (77,1%)
Fehlend	3 (2,5%)
Gesamt	121 (100%)

cM-Klassifikation

cM0	108 (89,3%)
cM1	12 (9,9%)
Fehlend	1 (0,8%)
Gesamt	121 (100%)

Histopathologisches Grading

G1 / G2 /	2 (1,7%) / 64 (52,9%) /
G3 / G4	47 (38,8%) / 2 (1,7%)
Fehlend	6 (5,0%)
Gesamt	121 (100%)

Tumorstadium

I	2 (1,7%)
II	7 (5,8%)
III	7 (5,8%)
IVa	90 (74,4%)
IVb	4 (3,3%)
IVc	9 (7,4%)
Fehlend	2 (1,7%)
Gesamt	121 (100%)

Entität	
PE-CA o.n.A.	65 (53,7%)
Nichtverhornend	15 (12,4%)
Verhornend	27 (22,3%)
Adenosquamös	5 (4,1%)
Undifferenziert	2 (1,7%)
Lymphoepithelial	2 (1,7%)
Carcinoma In Situ	2 (1,7%)
Basaloid	2 (1,7%)
Kleinzellig	1 (0,8%)
Fehlend	0 (0,0%)
Gesamt	121 (100%)
Anatomische Lokalisation	
Mundhöhle	11 (9,1%)
Oropharynx	40 (33,1%)
Hypopharynx	29 (24,0%)
Larynx	19 (15,7%)
Nasopharynx	6 (5,0%)
Mehretagentumor des Pharynx	13 (10,7%)
Lymphknoten	2 (1,7%)
Fehlend	1 (0,8%)
Gesamt	121 (100%)
HPV-Status	
P16 positiv	23 (19,0%)
P16 negativ	69 (57%)
Fehlend	29 (24,0%)
Gesamt	121 (100%)

Tabelle 14: Charakterisierung des Patientenkollektives zum Zeitpunkt der Kollektiv-Erstellung

4.2 Immunhistochemische Auswertung

Die vollständige immunhistochemische Auswertung der einzelnen Marker befindet sich im Anhang in den Tabellen A-J. Tabelle 15 zeigt zunächst die jeweilige Lokalisation der Markerfärbung innerhalb der Zelle.

Marker	Zellkern	Cytoplasma	Zellmembran
pAKT	Positiv	Positiv	
HiF1 α	Positiv	Positiv	
Survivin	Positiv		
CD44		Positiv	Positiv
ALDH1		Positiv	Positiv
PD-1			Positiv
PD-L1			Positiv
P16	Positiv		

Tabelle 15: Lokalisation der Markerdetektion

4.2.1 Immunhistochemische Abbildungen der einzelnen Marker

Im nachfolgenden Teil werden Beispiel-Bilder der immunhistochemischen Auswertung der jeweiligen Marker dargestellt. Es werden zunächst zwei Bilder eines Markes mit positiver Expression in 10x und 20x Vergrößerung gezeigt.

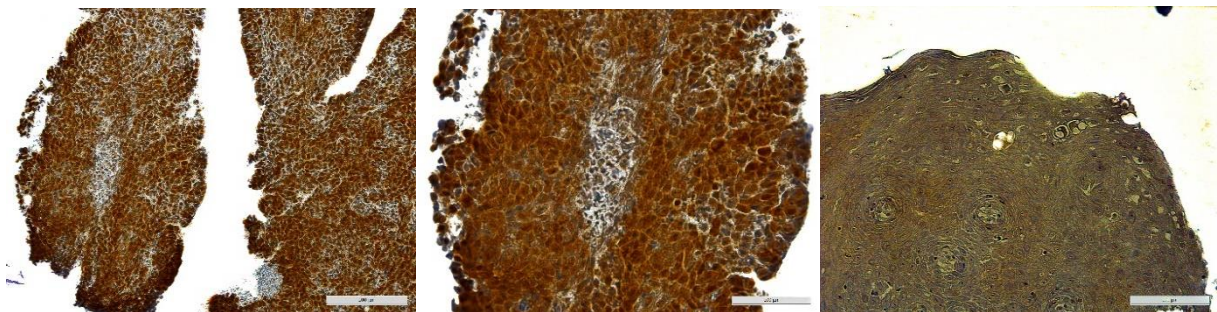


Abbildung 14: Immunhistochemische Darstellung von pAKT im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts)

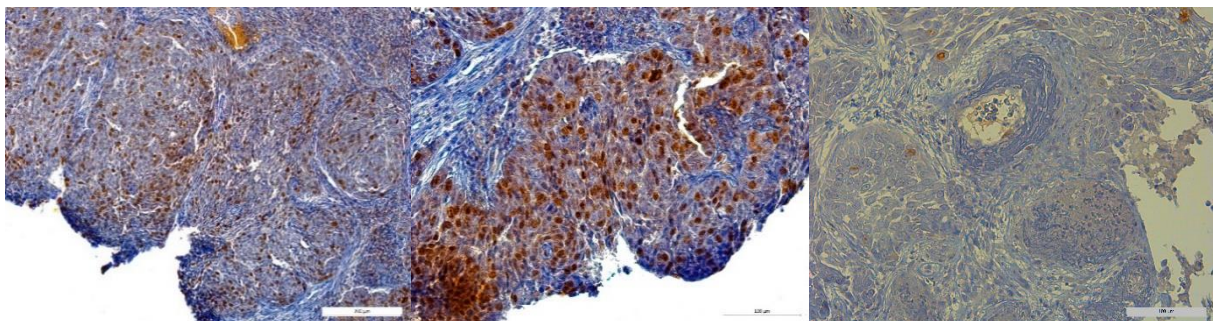


Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung von Survivin im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts)

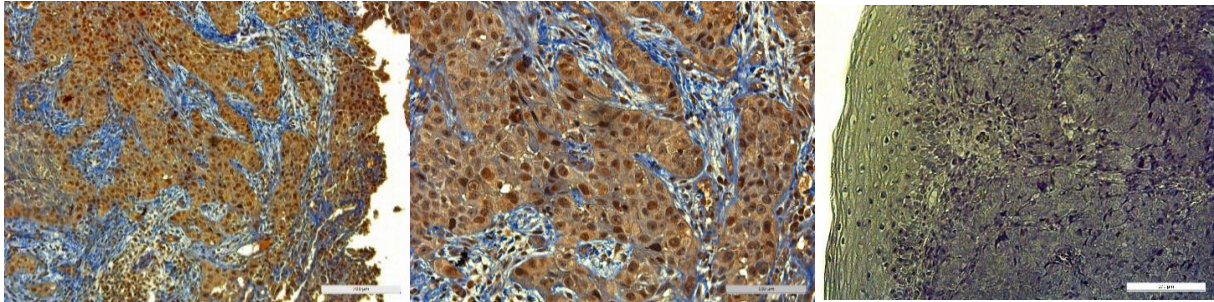


Abbildung 16: Immunhistochemische Darstellung von Hif1 α im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts)

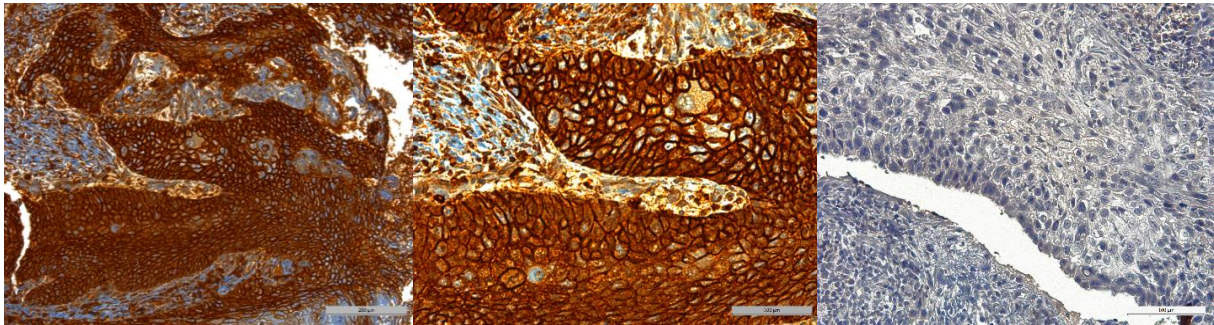


Abbildung 17: Immunhistochemische Darstellung von CD44 im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts)

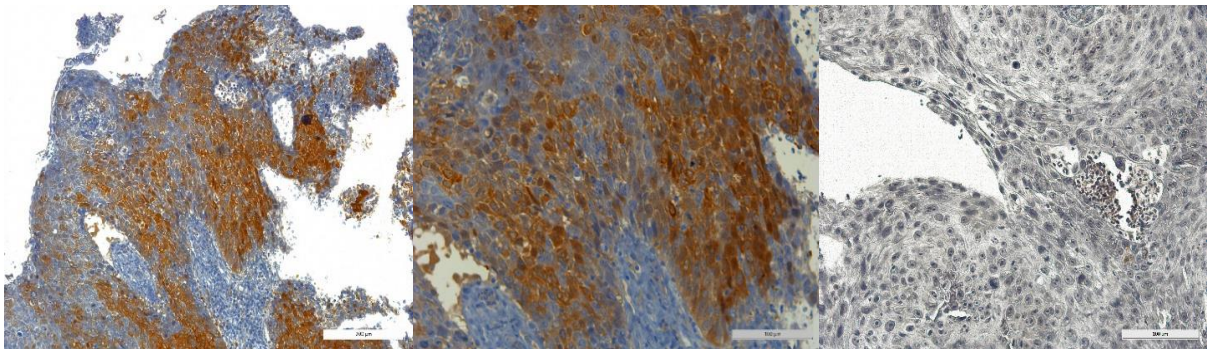


Abbildung 18: Immunhistochemische Darstellung von ALDH1 im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts)

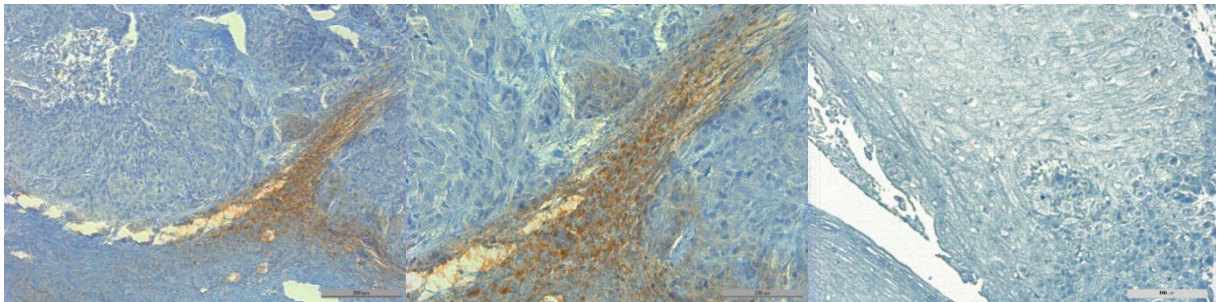


Abbildung 19: Immunhistochemische Darstellung von PD-1 im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts)

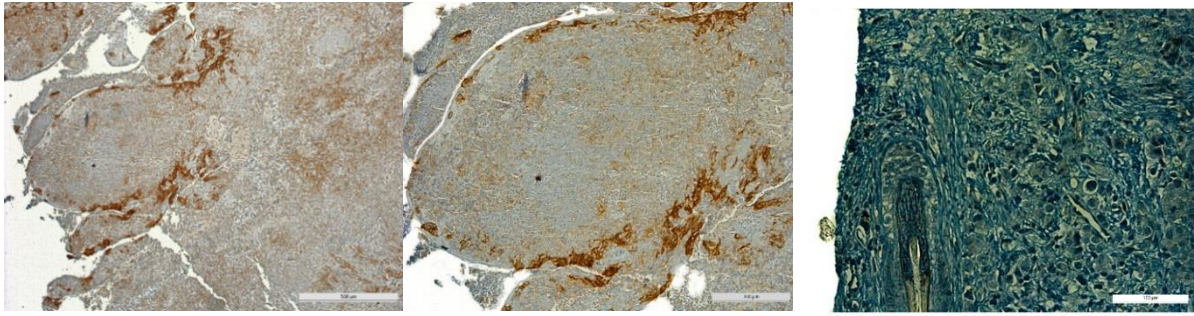


Abbildung 20: Immunhistochemische Darstellung von PD-L1 im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts)

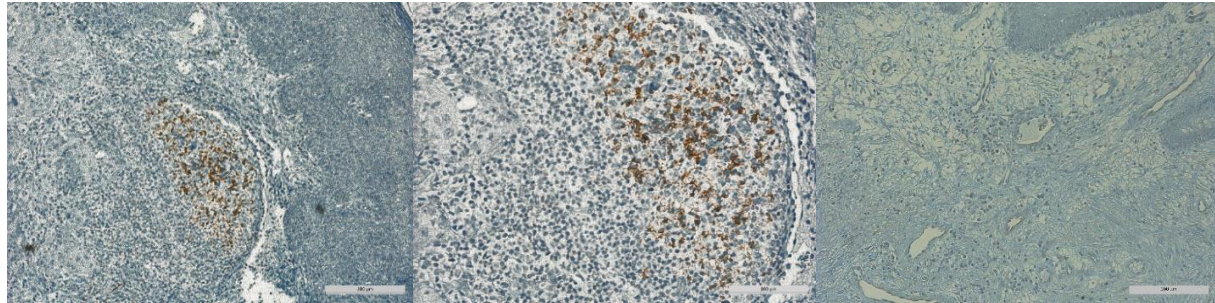


Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung von PD-1Immun im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 10x (von links nach rechts)

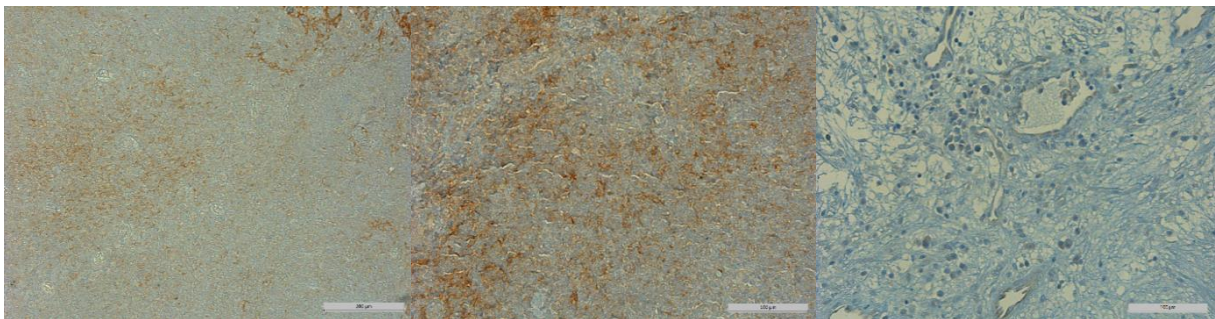


Abbildung 22: Immunhistochemische Darstellung von PD-L1Immun im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts)

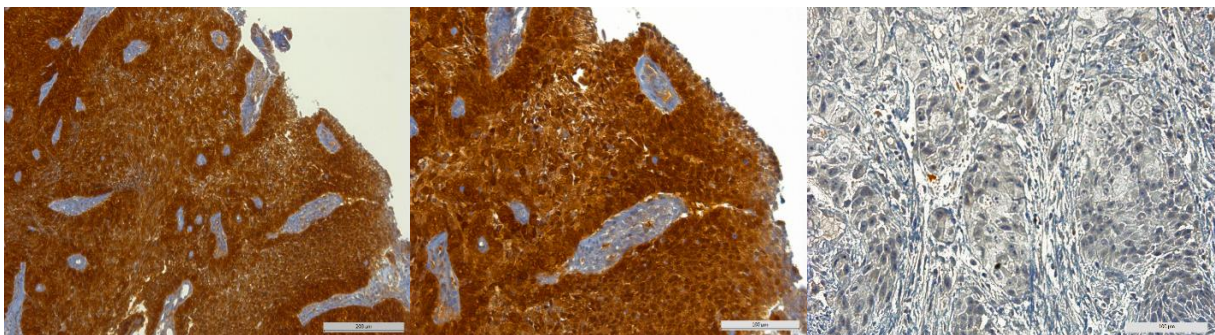


Abbildung 23: Immunhistochemische Darstellung von p16 im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts)

4.3 Statistische Auswertung

4.3.1 Korrelationsanalyse

Im Zuge der statistischen Auswertung der Immunhistochemie wurde im ersten Schritt eine Spearman-Korrelations-Analyse für sämtliche Marker durchgeführt (Ausnahme PD-1Immun und PD-L1Immun: hier erfolgte die Angabe lediglich in Prozent, es gibt noch keine validierten Scores). Hierbei wurden die jeweiligen Expressionsraten bivariat miteinander verglichen.

Es zeigte sich im ersten Schritt lediglich eine signifikante Korrelation zwischen Hif1 α und Survivin, deren Korrelationskoeffizient mit 0,218 ($p=0,038$) aber umso deutlicher ausfiel. Tabelle 16 veranschaulicht sämtliche Kombinationen von Korrelationen. Kein statistisch signifikanter Zusammenhang, jedoch ein Trend in der Korrelation lässt sich zudem für folgende Markerkombinationen feststellen:

pAkt und CD44: Korrelationskoeffizient -0,183 ($p=0,094$)

Survivin und CD44: Korrelationskoeffizient 0,179 ($p=0,090$)

			Korrelationen						
			AKT- Score	Survivin -Score	Hif1 Alpha- Score	CD44- Score	ALDH1 -Score	PDL1 Score	PD1S core
Spearman-Rho	AKT-Score	Korrelationskoeffizient	1,000	,128	,090	-,183	,079	-,055	,111
		Sig. (2-seitig)	.	,238	,412	,094	,486	,636	,335
		N	86	86	86	85	80	76	77
	Survivin-Score	Korrelationskoeffizient	,128	1,000	,218*	,179	,053	-,076	-,107
		Sig. (2-seitig)	,238	.	,038	,090	,627	,499	,334
		N	86	94	91	91	87	82	83
	Hif1Alpha-Score	Korrelationskoeffizient	,090	,218*	1,000	-,111	-,068	-,097	-,133
		Sig. (2-seitig)	,412	,038	.	,300	,534	,388	,231
		N	86	91	92	90	85	82	83
CD44-Score	Korrelationskoeffizient	-,183	,179	-,111	1,000	,101	,030	,058	
	Sig. (2-seitig)	,094	,090	,300	.	,534	,388	,231	

	Sig. (2-seitig)	,094	,090	,300	.	,354	,786	,601
	N	85	91	90	93	86	83	84
ALDH1-Score	Korrelationskoeffizient	,079	,053	-,068	,101	1,000	,042	-,041
	Sig. (2-seitig)	,486	,627	,534	,354	.	,712	,720
	N	80	87	85	86	88	80	80
PDL1Score	Korrelationskoeffizient	-,055	-,076	-,097	,030	,042	1,000	,042
	Sig. (2-seitig)	,636	,499	,388	,786	,712	.	,711
	N	76	82	82	83	80	84	81
PD1Score	Korrelationskoeffizient	,111	-,107	-,133	,058	-,041	,042	1,000
	Sig. (2-seitig)	,335	,334	,231	,601	,720	,711	.
	N	77	83	83	84	80	81	85

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

Tabelle 16: Ergebnisse der Spearman-Korrelationsanalyse für die einzelnen Marker

In weiterer Folge wurden klassische Risikofaktoren für HNSCC (Alkohol, Nikotin, p16-Status) mit dem Expressionsstatus der verschiedenen Marker im Tumorgewebe korreliert. Hierbei konnte eine positive Korrelation zwischen der p16-Expression und der Hif1 α - Expression gefunden werden (Korrelationskoeffizient: 0,260, $p=0,014$). Bezüglich des Alkoholkonsums sowie dem Rauchverhalten der Patienten konnte keine signifikante Korrelation zu den Markern gefunden werden. Jedoch zeigt sich, dass die p16-Expression negativ mit dem Alkoholkonsum korreliert (Korrelationskoeffizient: -0,265, $p=0,011$). Das bedeutet, dass Patienten mit positiver p16-Expression (Surrogatparameter für HPV-Infektion), vermehrt Nicht-Trinker sind. Tabelle 17 veranschaulicht die gefundenen Ergebnisse nochmals.

		P16	Alkohol	Nikotin	
Spearman-Rho	AKT-Score	Korrelationskoeffizient	,106	-,057	-,026
		Sig. (2-seitig)	,342	,603	,815
		N	83	85	85
	Survivin-Score	Korrelationskoeffizient	,164	,044	,160
		Sig. (2-seitig)	,123	,677	,126

	N	90	93	93
Hif1Alpha-Score	Korrelationskoeffizient	,260*	-,016	,157
	Sig. (2-seitig)	,014	,880	,137
	N	89	91	91
CD44-Score	Korrelationskoeffizient	-,008	,077	,048
	Sig. (2-seitig)	,940	,466	,652
	N	90	92	92
ALDH1-Score	Korrelationskoeffizient	,091	-,155	-,028
	Sig. (2-seitig)	,401	,151	,799
	N	87	87	87
PDL1Score	Korrelationskoeffizient	,132	-,003	,012
	Sig. (2-seitig)	,233	,977	,916
	N	83	83	83
PD1Score	Korrelationskoeffizient	,030	-,086	,147
	Sig. (2-seitig)	,790	,439	,182
	N	84	84	84
P16	Korrelationskoeffizient	1,000	-,265*	-,035
	Sig. (2-seitig)	.	,011	,744
	N	92	91	91

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig)

Tabelle 17: Spearman-Korrelation zwischen Alkoholkonsum / Rauchverhalten / p16-Expression und allen untersuchten Markern

4.3.2 Vier-Felder-Tafeln

Für die Zusammenhänge der weiteren klinischen Daten mit den jeweiligen Markerexpressionen im Tumorgewebe wurden in einem zweiten Schritt Vier-Felder-Tafeln mittels Chi-Quadrat-Test erstellt. Der mittlere Tumornachsorgezeitraum für die Erhebung der Daten betrug 3,2 Jahre bei einem Gesamtbeobachtungszeitraum von 10 Jahren. Als klinische Daten wurde die TNM-Klassifikation, histopathologisches Grading (G), das UICC-Tumorstadium sowie das Auftreten eines Tumorrezidives gewählt. Um die beiden Datenformen miteinander mittels Tests vergleichen zu können, wurden die Expressionsstadien der Marker in zwei Kategorien unterteilt: „positiv“ und „negativ“. Als positiv wurden jegliche Expressionen ≥ 2 gewählt (wie oben beschrieben Cut-Off bei 2). Als Ausnahmen sind hier PD-1 und PD-L1 zu nennen, bei denen der Cut-off bei 1 gewählt wurde. Bei den Markern PD-1 und PD-L1 wurde neben der Expression im Tumorgewebe auch die Expression in den Immunzellen bestimmt. Diese wird in Prozent (%) angegeben. Eine Positivität wurde

hier bei einer Expression der Immunzellen ab 1% festgelegt und ebenfalls in einen Expressionsscore mit 0 und 1 eingeordnet.

Insgesamt konnten nur wenige signifikante Zusammenhänge zwischen TNM-Klassifikation und Markerexpression hergestellt werden. Allerdings zeigte etwa das histopathologische Grading eine Signifikanz in Kombination mit dem p16-Status. So hatten jene Patienten mit einem negativem p16-Stadium ein signifikant niedrigeres histopathologisches Grading und waren somit gut bis mittelmäßig differenziert. Ebenso ließ das Tumorstadium eine Expression invers mit pAKT in Verbindung bringen. So zeigten jene Patienten mit fehlender pAKT-Expression eine signifikante Korrelation zu höheren Tumorstadien nach UICC (III / IV). Des Weiteren zeigte sich ein Trend für die Kombination von Hif1 α und dem Metastasierungsgrad (M-Stadium). Es lässt sich rückschließen, dass jene Patienten ohne Fernmetastasen eine positive Hif1 α -Expression vorweisen. Für keinen der untersuchten Marker konnte eine Korrelation für das Vorliegen von Rezidiven gefunden werden. Die statistisch signifikanten Ergebnisse sowie Trends sind nachfolgend in den Tabellen 18, 19 und 20 übersichtlich dargestellt.

Kreuztabelle

		P16		Gesamt	
		0	1		
G Cutoff	G1/G2	Anzahl	44	7	51
		Erwartete Anzahl	38,3	12,8	51,0
		% innerhalb von P16	63,8%	30,4%	55,4%
		% der Gesamtzahl	47,8%	7,6%	55,4%
	G3/G4	Anzahl	25	16	41
		Erwartete Anzahl	30,8	10,3	41,0
		% innerhalb von P16	36,2%	69,6%	44,6%
		% der Gesamtzahl	27,2%	17,4%	44,6%
Gesamt	Anzahl	69	23	92	
	Erwartete Anzahl	69,0	23,0	92,0	
	% innerhalb von P16	100,0%	100,0%	100,0%	
	% der Gesamtzahl	75,0%	25,0%	100,0%	

Chi-Quadrat-Tests

Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
------	----	--	-------------------------------	-------------------------------

Chi-Quadrat nach Pearson	7,758 ^a	1	,005		
Kontinuitätskorrektur ^b	6,468	1	,011		
Likelihood-Quotient	7,829	1	,005		
Exakter Test nach Fisher				,007	,005
Zusammenhang linear-mit-linear	7,674	1	,006		
Anzahl der gültigen Fälle	92				

a. 0 Zellen haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 10,25.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Tabelle 18: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination G und Hif1α

Kreuztabelle

		AKTCutOff		Gesamt	
		0	1		
Stage CutOff	SI / SII	Anzahl	4	5	9
		Erwartete Anzahl	6,8	2,2	9,0
		% innerhalb von AKTCutOff	6,2%	23,8%	10,5%
		% der Gesamtzahl	4,7%	5,8%	10,5%
SIII / SIV		Anzahl	61	16	77
		Erwartete Anzahl	58,2	18,8	77,0
		% innerhalb von AKTCutOff	93,8%	76,2%	89,5%
		% der Gesamtzahl	70,9%	18,6%	89,5%
Gesamt		Anzahl	65	21	86
		Erwartete Anzahl	65,0	21,0	86,0
		% innerhalb von AKTCutOff	100,0%	100,0%	100,0%
		% der Gesamtzahl	75,6%	24,4%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

		Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,280 ^a	1	,022			
Kontinuitätskorrektur ^b	3,564	1	,059			
Likelihood-Quotient	4,546	1	,033			

Exakter Test nach Fisher					,036	,036
Zusammenhang linear-mit-linear	5,219	1	,022			
Anzahl der gültigen Fälle	86					

a. 1 Zellen (25,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,20.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Tabelle 19: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination Stage und pAkt

Kreuztabelle

		HifCutoff		Gesamt	
		0	1		
CM cutoff	M0	Anzahl	27	52	79
		Erwartete Anzahl	29,8	49,2	79,0
		% innerhalb von HifCutoff	79,4%	92,9%	87,8%
		% der Gesamtzahl	30,0%	57,8%	87,8%
	M1	Anzahl	7	4	11
		Erwartete Anzahl	4,2	6,8	11,0
		% innerhalb von HifCutoff	20,6%	7,1%	12,2%
		% der Gesamtzahl	7,8%	4,4%	12,2%
Gesamt		Anzahl	34	56	90
		Erwartete Anzahl	34,0	56,0	90,0
		% innerhalb von HifCutoff	100,0%	100,0%	100,0%
		% der Gesamtzahl	37,8%	62,2%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	3,565 ^a	1	,059		
Kontinuitätskorrektur ^b	2,422	1	,120		
Likelihood-Quotient	3,445	1	,063		
Exakter Test nach Fisher				,094	,062

Zusammenhang linear- mit-linear	3,525	1	,060		
Anzahl der gültigen Fälle	90				

a. 1 Zellen (25,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,16.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Tabelle 20: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination cM und Hif1 α (nicht signifikant)

Da Patienten mit positivem HPV-Status als eigene Entitäten innerhalb der HNSCCs gelten, wurde das Patientenkollektiv in einem weiteren Schritt in p16-positive (p16+) und p16-negative (p16-) Gruppen unterteilt und die Berechnungen nochmals durchgeführt. Auch dies führte zu keinen nennenswerten Korrelationen innerhalb beider Subgruppen. Lediglich bei den p16-positiven HNSCCs lässt sich ein Trend im Zusammenhang von hohem histopathologischen Grading G und hoher ALDH1-Expression ($p=0,062$), sowie hohem Tumorstadium (Stage) und niedriger pAkt-Expression ($p=0,071$) vermuten. Tabelle 21 und 22 stellen diese Ergebnisse dar.

Kreuztabelle

		ALDHCutoff		Gesamt
		0	1	
G Cutoff 0	Anzahl	5	2	7
	Erwartete Anzahl	2,8	4,2	7,0
	% innerhalb von ALDHCutoff	62,5%	16,7%	35,0%
	% der Gesamtzahl	25,0%	10,0%	35,0%
1	Anzahl	3	10	13
	Erwartete Anzahl	5,2	7,8	13,0
	% innerhalb von ALDHCutoff	37,5%	83,3%	65,0%
	% der Gesamtzahl	15,0%	50,0%	65,0%
Gesamt	Anzahl	8	12	20
	Erwartete Anzahl	8,0	12,0	20,0
	% innerhalb von ALDHCutoff	100,0%	100,0%	100,0%
	% der Gesamtzahl	40,0%	60,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat Pearson nach	4,432 ^a	1	,035		
Kontinuitätskorrektur ^b	2,647	1	,104		
Likelihood-Quotient	4,499	1	,034		
Exakter Test nach Fisher				,062	,052
Zusammenhang linear-mit-linear	4,211	1	,040		
Anzahl der gültigen Fälle	20				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,80.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Tabelle 21: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination G und ALDH1 bei p16-positiven HNSCC (nicht signifikant)

Kreuztabelle

			AKTCutOff		Gesamt
			0	1	
Stage CutOff	0	Anzahl	0	2	2
		Erwartete Anzahl	1,4	,6	2,0
		% innerhalb von AKTCutOff	0,0%	33,3%	9,5%
		% der Gesamtzahl	0,0%	9,5%	9,5%
	1	Anzahl	15	4	19
		Erwartete Anzahl	13,6	5,4	19,0
		% innerhalb von AKTCutOff	100,0%	66,7%	90,5%
		% der Gesamtzahl	71,4%	19,0%	90,5%
Gesamt	Anzahl	15	6	21	
	Erwartete Anzahl	15,0	6,0	21,0	
	% innerhalb von AKTCutOff	100,0%	100,0%	100,0%	
	% der Gesamtzahl	71,4%	28,6%	100,0%	

		Chi-Quadrat-Tests				
		Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat Pearson	nach	5,526 ^a	1	,019		
Kontinuitätskorrektur ^b		2,335	1	,127		
Likelihood-Quotient		5,571	1	,018		
Exakter Test nach Fisher					,071	,071
Zusammenhang linear-mit-linear		5,263	1	,022		
Anzahl der gültigen Fälle		21				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 0,57.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Tabelle 22: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination Stage und pAkt bei p16-positiven HNSCC (nicht signifikant)

4.3.3 Überlebenskurven – Kaplan-Meier-Analysen

4.3.3.1 Gesamtüberleben

Ebenso wurden für die einzelnen Marker Kaplan-Meier-Analysen sowie Log-Rank-Tests durchgeführt, um sie hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft auf das Gesamtüberleben (Overall Survival, OS) zu prüfen. Wiederum wurde für sämtliche Marker ein Cut-off-Wert von 2 gesetzt (Ausnahme: PD-1 und PD-L1: hier wurde der Cut-off-Wert bei 1 gewählt). Auch hier wurde der Expressionsstatus wiederum nur im Tumorgewebe (Ausnahme PD-1 und PD-L1: separate Score-Auswertung für Expression der Immunzellen im Tumorgewebe) erhoben.

In den nachfolgenden Auswertungen konnte sich p16 als Prognosemarker beweisen. Für Patienten mit positiver p16-Expression konnte ein statistisch signifikantes längeres Gesamtüberleben berechnet werden im Vergleich zu jenen Patienten, bei denen keine Expression festgestellt wurde.

Zudem konnten für PD-L1 sowie PD-1-Expressionen im Tumorgewebe Trends für das Gesamtüberleben gefunden werden. Erhöhte PD-L1-Expression scheint mit einem verlängertem Gesamtüberleben zu korrelieren, während erhöhte PD-1-Expression zu einem verkürzten Gesamtüberleben führen könnte. Für PD-1 gilt es hier allerdings die geringe

Fallzahl mit positiver Expression zu beachten. Tabelle 23 fasst die Ergebnisse des Log-Rank-Tests zusammen.

Log-Rank Test	
Marker	p-Wert
pAkt	0,221
Survivin	0,474
HiF1 α	0,668
CD44	0,167
ALDH1	0,294
PD-L1	0,083
PD-1	0,091
PD-L1Immun	0,213
PD-1Immun	0,244
P16	0,014

Tabelle 23: p-Werte des Log-Rank Tests für Kaplan-Meier Analysen der einzelnen Marke für Gesamtüberleben

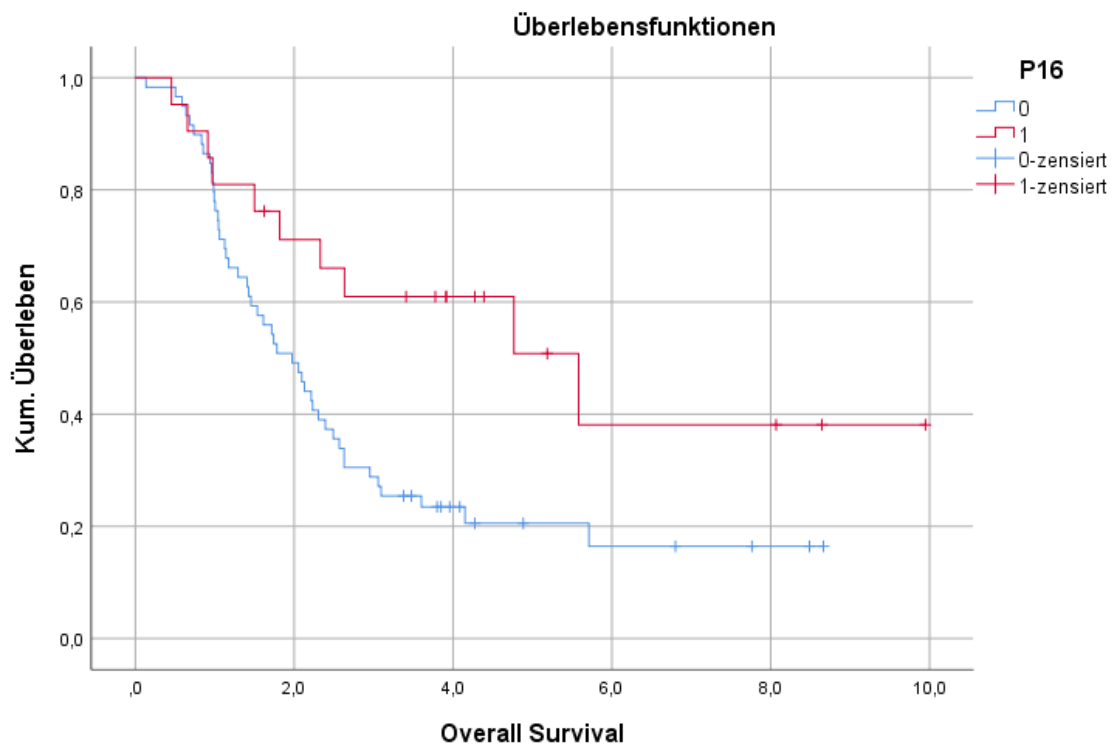


Abbildung 24: Überlebenskurve für p16 (p=0,014; n=80)

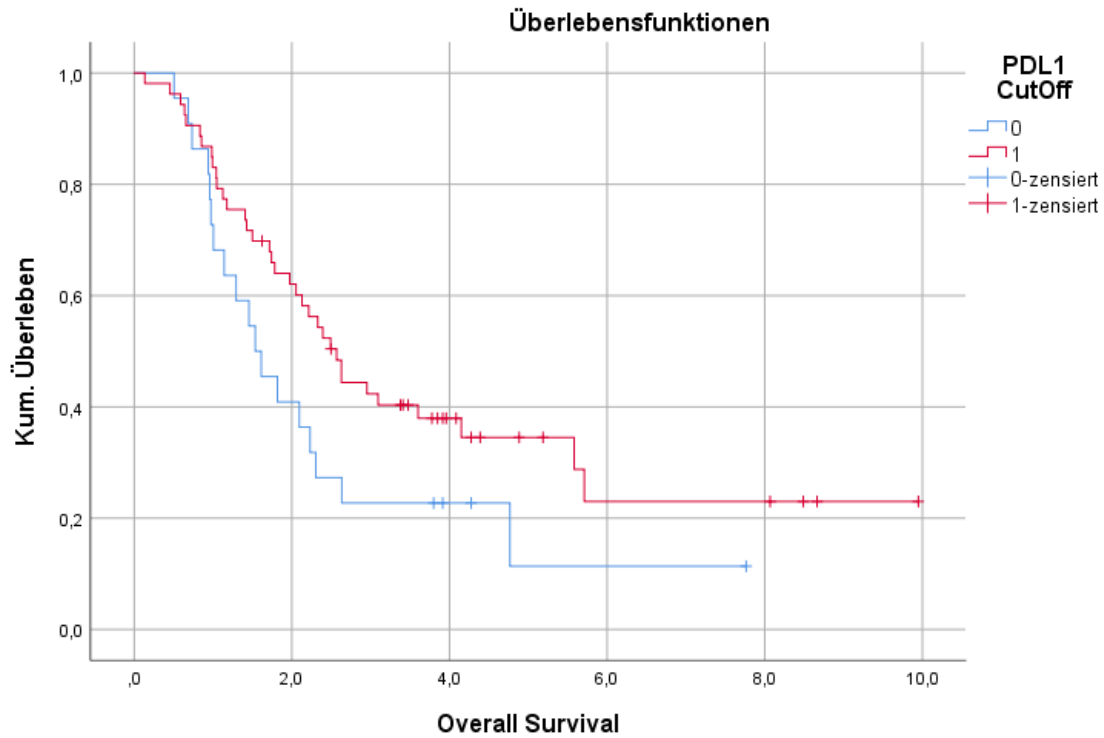


Abbildung 25: Überlebenskurve für PD-L1 ($p=0,083$; $n=75$; nicht signifikant)

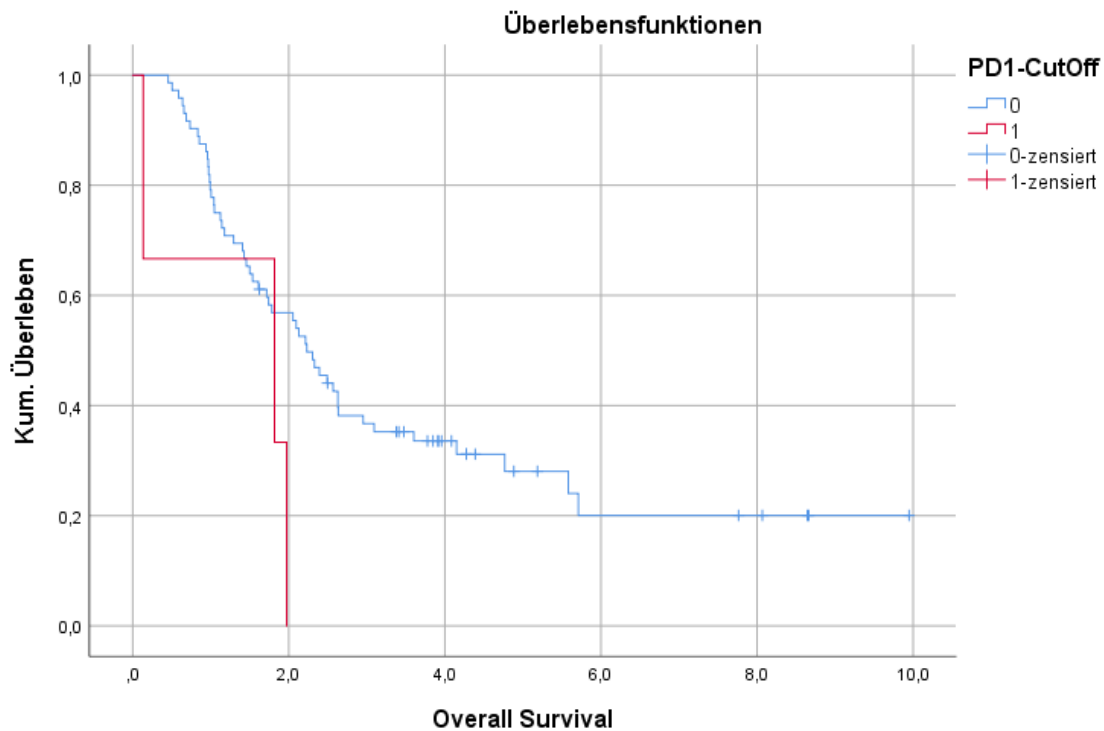


Abbildung 26: Überlebenskurve für PD-1 ($p=0,091$; $n=75$; nicht signifikant)

Wie bei den Vier-Felder-Tafeln wurde das Patientenkollektiv zur näheren Betrachtung in p16-positiv und p16-negativ unterteilt und obenstehende Berechnungen hinsichtlich OS erneut

durchgeführt. Leider konnten weder für p16-positive noch für p16-negative HNSCCs Signifikanzen bzw. Tendenzen gefunden werden.

Schließlich wurde der Fokus auf jene Marker gelegt, die in der Spearman-Korrelation einen Zusammenhang zeigten oder zumindest einen Trend vermuten ließen. Es wurden somit jene Patienten herausgefiltert, die eine Überexpression beider Marker aufwiesen, und erneut hinsichtlich der Überlebenszeit analysiert. Ferner wurden jene Patienten mit doppelter Noxenbelastung, also jene mit positiver Alkohol- als auch Nikotinanamnese, untersucht. Die nachfolgende Tabelle zeigt die berücksichtigten Markerkombinationen:

Log-Rank Test	
Marker	p-Wert
HiF1 α + Survivin	0,488
CD44 + Survivin	0,749
CD44 + pAkt	0,543
P16 + HiF1 α	0,006
Alkohol + Nikotin	0,700

Tabelle 24: p-Werte des Log-Rank Tests für Kaplan-Meier-Analysen der einzelnen Marker für OS

In dieser kombinierten Analyse konnten sich die zuvor gefundenen Korrelationen größtenteils nicht mehr durchsetzen. Hif1 α und Survivin, welche als einzige eine signifikante Korrelation im Spearman-Test zeigten, ließen in Kombination ebenso wenig eine Aussage auf das OS zu, wie die Kombination von CD44 mit Survivin bzw. pAkt. Auffällig war die Korrelation bei den p16-positiven Patienten mit gleichzeitig erhöhter Hif1 α -Expression. Diese zeigten ein signifikant verlängertes OS ($p=0,006$).

Eine kombinierte Alkohol- und Nikotinanamnese zeigten wie schon zuvor in der einzelnen Betrachtung keinerlei Zusammenhang zum OS.

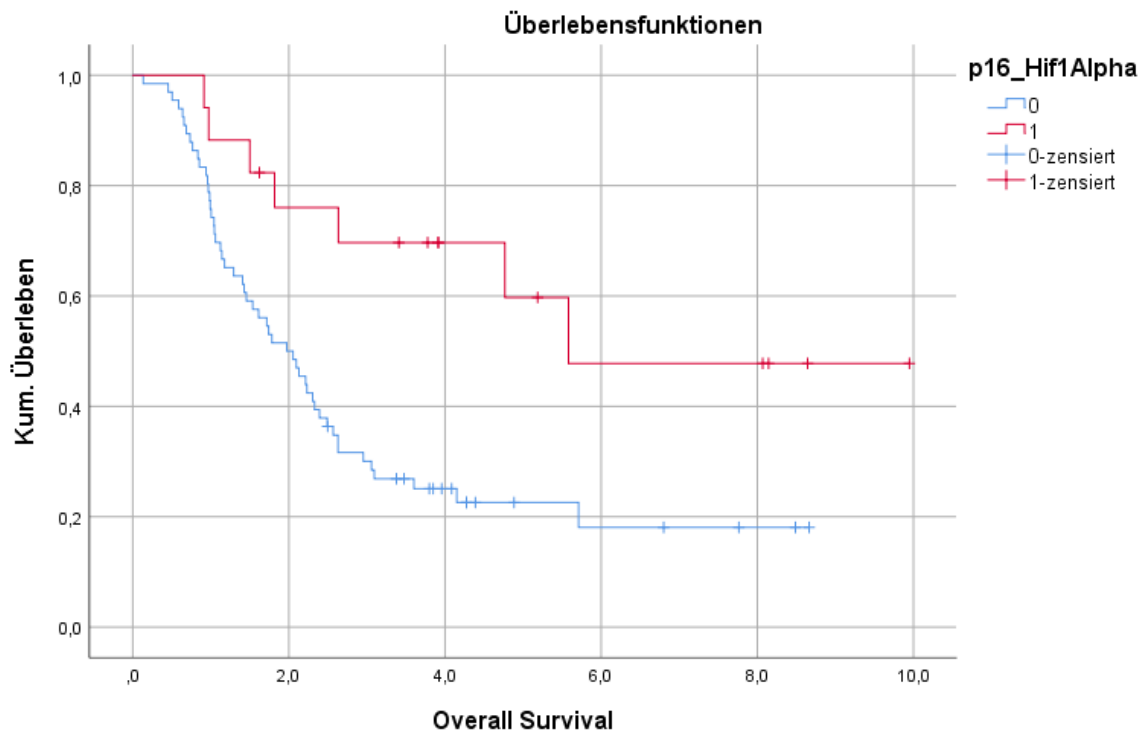


Abbildung 27: Überlebenskurve für p16-positive HNSCCs und HiF1α (p = 0,006; n = 83)

4.3.3.2 Krankheitsfreies Überleben

Die Marker wurden ebenfalls mittels Kaplan-Meier-Analysen sowie Log-Rank-Tests hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft auf das krankheitsfreie Überleben (Disease Free Survival, DFS) geprüft. Wiederum wurde für sämtliche Marker ein Cut-off-Wert von 2 gesetzt (Ausnahme: PD-1 und PD-L1: hier wurde der Cut-off bei 1 gewählt). Auch hier wurde der Expressionsstatus wiederum nur im Tumorgewebe erhoben (Ausnahme PD-1 und PD-L1-Immunzellen-Expression im Tumorgewebe). Tabelle 25 fasst die Ergebnisse des Log-Rank-Tests zusammen.

Hier konnten keine statistischen Signifikanzen errechnet werden. Gerade nicht statistisch signifikant, jedoch mit eindeutiger Tendenz waren die Expression von PD-L1 und PD-1 in den Immunzellen der untersuchten Tumorgewebe (p=0,095 bzw. p=0,080). Patienten mit hoher PD-L1-, bzw. PD-1-Expression in den Immunzellen zeigten einen Trend hin zu verlängertem DFS.

Log-Rank Test	
Marker	p-Wert
pAkt	0,116
Survivin	0,767
HiF1 α	0,419
CD44	0,320
ALDH1	0,607
PD-L1	0,181
PD-1	0,324
PD-L1Immun	0,095
PD-1Immun	0,080
P16	0,455

Tabelle 25: p-Werte des Log-Rank Tests für Kaplan-Meier-Analysen der einzelnen Marker für DFS

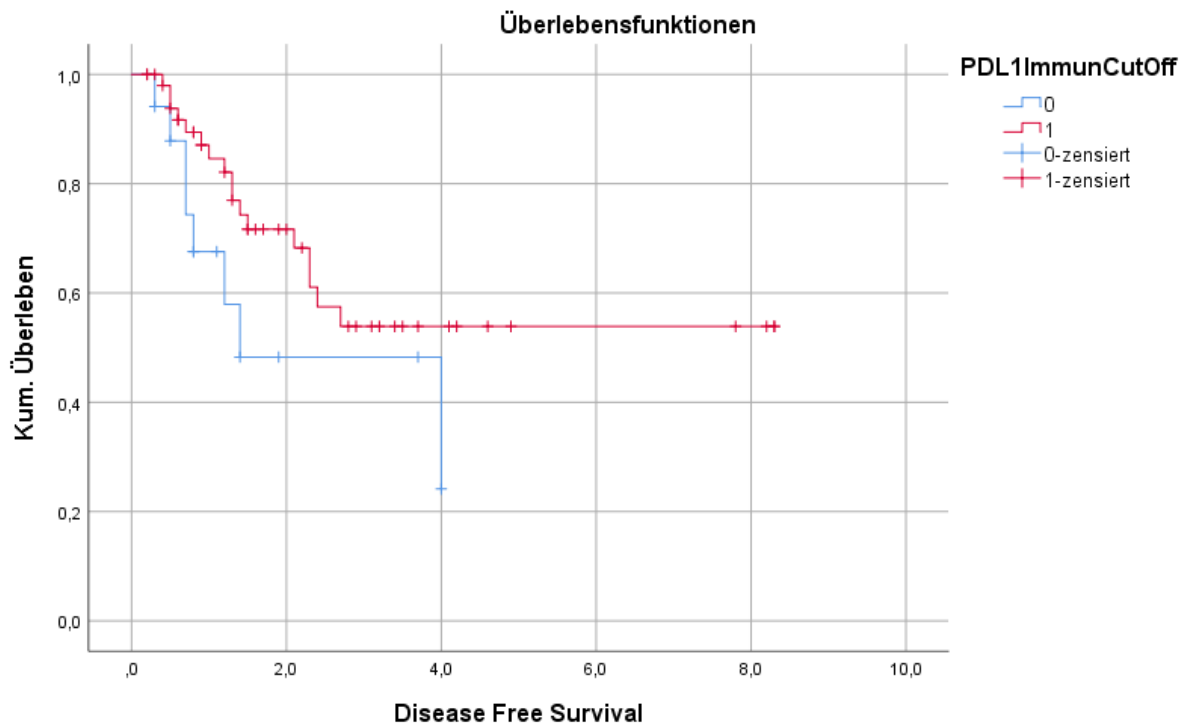


Abbildung 28: DFS-Überlebenskurve für Marker PD-L1Immun ($p=0,095$; $n=69$; nicht signifikant)

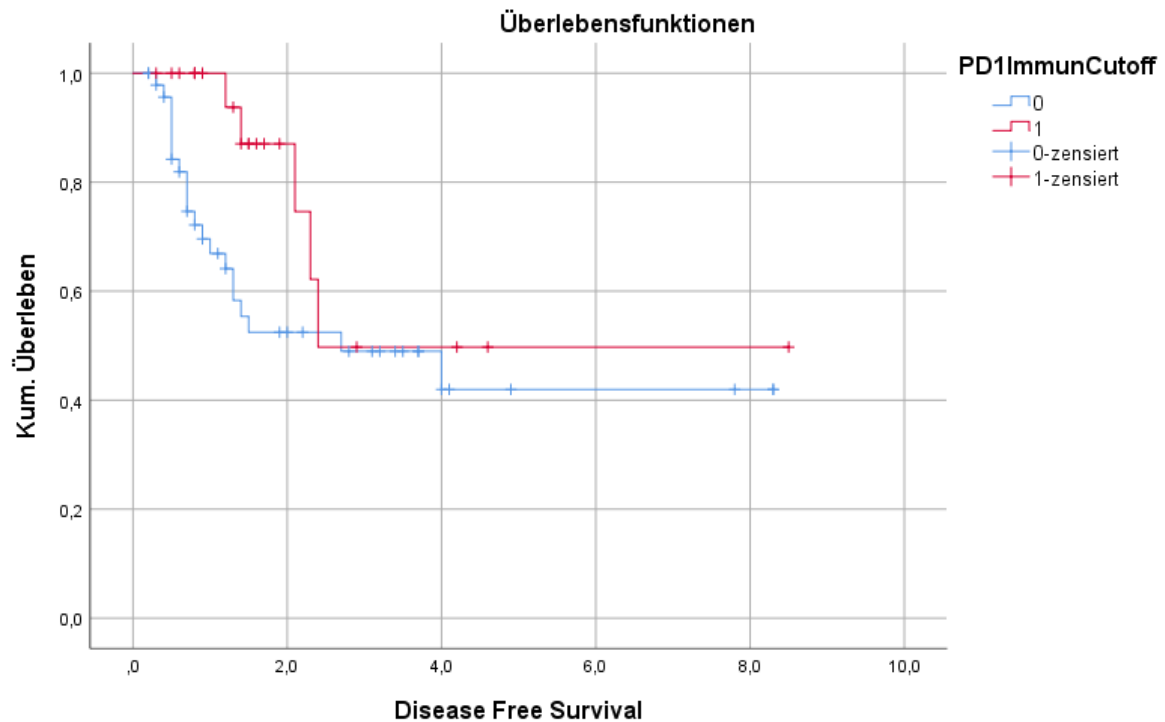


Abbildung 29: DFS-Überlebenskurve für PD-1Immun ($p=0,080$; $n=71$; nicht signifikant)

Wie bereits für das OS zuvor, wurde das Patientenkollektiv zur näheren Betrachtung in p16-positiv und p16-negativ unterteilt und obenstehende Berechnungen erneut durchgeführt. Unter den p16-negativen HNSCCs konnte sich erneut ein Trend für PD-L1Immun ($p=0,083$) als Prognosemarker für DFS finden. Jene Patienten mit hoher PD-L1Immun-Expression scheinen ein verlängertes DFS aufzuweisen.

Unter den p16-positiven HNSCCs konnte sich kein Marker signifikant durchsetzen.

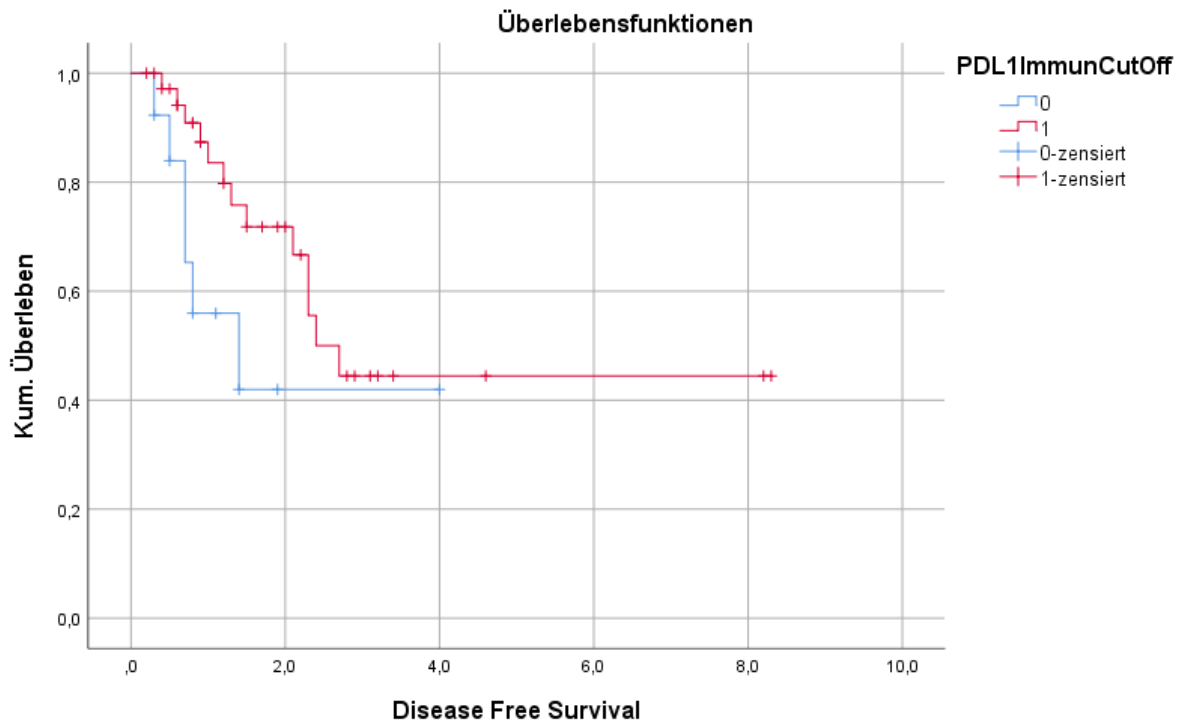


Abbildung 30: DFS-Überlebenskurve für PD-L1Immun bei p16-negativen HNSCCs ($p=0,083$; $n=50$; nicht signifikant)

Abschließend wurden auch für das DFS jene Marker in Kombination betrachtet, die im Spearman-Test eine Korrelation aufwiesen. Hinsichtlich des DFS konnte hier für keine der Markerkombinationen eine signifikante Korrelation gefunden werden. Tabelle 26 zeigt die gefundenen p-Werte im log-Rank-Test.

Log-Rank Test	
Marker	p-Wert
HiF1 α + Survivin	0,444
CD44 + Survivin	0,595
CD44 + pAkt	0,270
P16 + HiF1 α	0,164
Alkohol + Nikotin	0,229

Tabelle 26: p-Werte des Log-Rank Tests für Kaplan-Meier-Analysen der Marker-Kombinationen für DFS

4.3.4 Cox-Regressions-Model

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analysen wurden zur weiteren Beurteilung multivariate Analysen in Form von Cox-Regressions-Modellen durchgeführt. Ähnlich wie bei den Kaplan-Meier-Analysen war hier die Fragestellung interessant, inwieweit Markerkombinationen im Gegensatz zu Einzelmarkern bessere Aussagen bezüglich Prognosepotential (OS, DFS) zuließen. Diese Forschungsfrage ist aufgrund der sehr heterogenen Prozesse bei HNSCCs enorm wichtig.

In die jeweiligen Modelle wurden nur jene Marker aufgenommen, die in den Kaplan-Meier-Analysen Signifikanzen (Nicht-Überschneiden der Kurven) für OS und DFS oder zumindest Trends ($p < 0,1$) hinsichtlich positiver und negativer Expression zeigten und die Voraussetzungen der Mindestgruppengröße von 10 Personen pro Gruppe sowie proportionaler Hazards erfüllten.

Der Marker p16 zeigte diesem Modell zur Folge einen signifikanten Effekt auf das OS. Patienten mit positiver p16 Expression zeigten statistisch signifikant ein bis zu 64,7% verringertes Sterblichkeitsrisiko (verlängertes OS) ($HR = 0,353$; $p = 0,005$; CI: 0,170 bis 0,733). Gerade nicht signifikant zeigten sich PD-1 ($HR = 3,116$; $p = 0,064$; CI: 0,937 bis 10,364) und PD-L1 ($HR = 0,576$; $p = 0,060$; CI: 0,324 bis 1,023). Positive Expressionen von PD-1 könnten darauf hindeuten, dass sie mit bis zu 3-fach erhöhtes Sterberisiko (verkürztem OS) assoziiert sind. Positive PD-L1-Expression könnte zudem mit einem bis zu 36% verringerten Sterberisiko (verlängertem OS) einhergehen.

In Bezug auf das DFS konnten sich keiner der Marker, welche sich in den Kaplan Meier Analysen noch mit einem Trend zeigten, durchsetzen. Allerdings ist in diesem Fall anzumerken, dass diese Berechnung aufgrund der sehr geringen Fallzahl von lediglich 16 Fällen und fünf Ereignissen streng genommen die Voraussetzungen für die Durchführung einer Cox-Regression nicht erfüllt.

Für sämtliche weitere Marker bzw. Markerkombinationen ergaben sich keine weiteren Hinweise bezüglich eines positiven Prognosepotentials im Hinblick auf das Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben.

Auswertung der Fallverarbeitung

		N	Prozent
Für Analyse verfügbare Fälle	Ereignis ^a	53	43,8%
	Zensiert	19	15,7%
	Insgesamt	72	59,5%
Nicht verwendete Fälle	Fälle mit fehlenden Werten	49	40,5%
	Fälle mit negativer Zeit	0	0,0%
	Zensierte Fälle vor dem frühesten Ereignis in einer Schicht	0	0,0%

Insgesamt	49	40,5%
Insgesamt	121	100,0%

a. Abhängige Variable: Overall Survival

Omnibus-Tests der Modellkoeffizienten

-2 Log-Likelihood
389,566

Omnibus-Tests der Modellkoeffizienten^a

-2 Log-Likelihood	Gesamt (Wert)			Änderung aus vorangegangenem Schritt			Änderung aus vorangegangenem Block		
	Chi-Quadrat	df	Signifikanz	Chi-Quadrat	df	Signifikanz	Chi-Quadrat	df	Signifikanz
375,387	13,791	3	,003	14,179	3	,003	14,179	3	,003

a. Beginnen mit Block-Nr. 1. Methode = Einschluß

Variablen in der Gleichung

	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)	95,0% Konfidenzinterv. für Exp(B)	
							Untere	Obere
PD-1-CutOff	1,137	,613	3,435	1	,064	3,116	,937	10,364
PD-L1 CutOff	-,552	,294	3,540	1	,060	,576	,324	1,023
P16	-1,042	,373	7,806	1	,005	,353	,170	,733

Korrelationsmatrix der Regressionskoeffizienten

	PD-1-CutOff	PD-L1 CutOff
PD-L1 CutOff		-,012
P16	-,145	,067

Kovariaten- Mittelwerte

	Mittelwert
PD-1-CutOff	,042
PD-L1 CutOff	,708
P16	,264

Tabelle 27: Cox-Regressionsmodell für Overall Survival

Auswertung der Fallverarbeitung

		N	Prozent
Für Analyse verfügbare Fälle	Ereignis ^a	24	19,8%
	Zensiert	41	33,9%
	Insgesamt	65	53,7%
Nicht verwendete Fälle	Fälle mit fehlenden Werten	54	44,6%
	Fälle mit negativer Zeit	0	0,0%
	Zensierte Fälle vor dem frühesten Ereignis in einer Schicht	2	1,7%
	Insgesamt	56	46,3%
Insgesamt		121	100,0%

a. Abhängige Variable: Disease Free Survival

Omnibus- Tests der Modellkoeffizienten

-2 Log-Likelihood
173,685

Omnibus-Tests der Modellkoeffizienten^a

-2 Log-Likelihood	Gesamt (Wert)			Änderung aus vorangegangenem Schritt			Änderung aus vorangegangenem Block		
	Chi-Quadrat	df	Signifikanz	Chi-Quadrat	df	Signifikanz	Chi-Quadrat	df	Signifikanz
169,851	3,976	2	,137	3,833	2	,147	3,833	2	,147

a. Beginnen mit Block-Nr. 1. Methode = Einschluß

Variablen in der Gleichung

	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
PD-1ImmunCutoff	-,607	,510	1,419	1	,233	,545
PD-L1ImmunCutOff	-,615	,438	1,968	1	,161	,541

Kovariaten-Mittelwerte

	Mittelwert
PD-1ImmunCutoff	,338
PD-L1ImmunCutOff	,738

Tabelle 28: Cox-Regression für Disease Free Survival

4.3.5 Untersuchung der Feldrand-Rezidive

4.3.5.1 Vier-Felder-Tafeln für Strahlendaten

Ein weiterer wichtiger Teil der vorliegenden Arbeit bezieht sich auf die Untersuchung der Feldrandrezidive, um so indirekte Hinweise auf ein mögliches Migrationsverhalten des Tumors unter adjuvanter Radiochemotherapie zu erhalten. Dabei wurde die im Kapitel 3.2.4 beschriebene Methode verwendet. Es sollte untersucht werden, ob es bestimmte Markerexpressionen gab, bei denen die Rezidive vermehrt innerhalb oder außerhalb des geplanten Bestrahlungsbereiches (PTV), bzw. des geplanten Hochdosisbereiches (Boost) des jeweiligen Ursprungstumors lagen. Hierzu wurden ebenfalls wieder Vier-Felder-Tafeln berechnet. Als Cut-Off wurde für die Marker wiederum 2 gewählt (Ausnahme PD-1 und PD-L1: 1). Als Cut-Off für PTV und Boost wurden 95% gewählt. Alle Volumenanteile der Rezidive am Volumen des Ursprungstumors, die über 95% lagen, galten als „im PTV“ bzw. „im Boost“ (in den Tabellen mit „1“ bezeichnet), alle Volumenanteile der Rezidive, die gleich oder unter 95% betragen, wurden als „außerhalb PTV“ bzw. „außerhalb Boost“ gewertet (in den Tabellen mit „0“ bezeichnet). Da einerseits die Immunhistochemie einiger Rezidiv-Patienten nicht zur Verfügung stand (teilweise zu wenig restliches Tumormaterial auf den histologischen Blöcken), und es sich bei den Rezidiv-Patienten andererseits um eine sehr kleine Gruppe von n=30 handelte, konnten zur Berechnung eine maximale Anzahl von n=17 Patienten herangezogen werden.

Aufgrund der geringen Fallzahl an Patienten mit Rezidiven konnten im Rahmen der Statistik keine signifikanten Korrelationen der Marker mit dem Verhalten des Tumors während der Strahlentherapie berechnet werden. Ungeachtet dessen lassen sich auch bei der geringen Fallzahl einige Trends anhand der Vier-Felder-Tafeln für pAkt, CD44, PD-L1, PD-L1Immunzell

und p16 für die Entstehung von Rezidiven im Bestrahlungsbereich ableiten. Dennoch bleibt an dieser Stelle anzumerken, dass Feldrandrezidive lediglich einen Hinweis für strahlenassoziierte Migration darstellen können. Die exakte Kausalität muss definitiv in geeigneteren Studiendesigns geklärt werden (siehe dazu 5.3.6 Probleme). Die Ergebnisse sind in den nachstehenden Tabellen rein deskriptiv dargestellt.

1. Niedrige pAkt-Expression scheint mit geringerem Migrationsverhalten des Tumors und in weiterer Konsequenz mit verringerter Rezidivneigung assoziiert zu sein.
2. Hohe Survivin-Expression scheint mit geringerem Migrationsverhalten des Tumors assoziiert zu sein.
3. Hohe PD-L1-Expression scheint mit geringerem Migrationsverhalten des Tumors assoziiert zu sein.
4. Niedrige PD-L1-Immune-Expression scheint mit geringerem Migrationsverhalten des Tumors assoziiert zu sein.
5. P16 negative (p16-) Tumore scheinen mit geringerem Migrationsverhalten des Tumors assoziiert zu sein.

Kreuztabelle

Anzahl

		AKT Cut-off		Gesamt
		0	1	
95%	0	3	1	4
Bestrahlungsbereich (0/1)	1	11	0	11
Gesamt		14	1	15

Tabelle 29: pAkt und Migrationsverhalten des Tumors unter Strahlentherapie

Kreuztabelle

Anzahl

		Survivin Cut-off		Gesamt
		0	1	
Im Bestrahlungsbereich nein/ja	0	5	0	5
	1	7	6	13
Gesamt		12	6	18

Tabelle 30: Survivin und Migrationsverhalten des Tumors unter Strahlentherapie

Kreuztabelle

Anzahl

		PD-L1 Cut-off		Gesamt
		0	1	
95%	0	1	4	5
Bestrahlungsbereich (0/1)	1	5	8	13
Gesamt		6	12	18

Tabelle 31: PD-L1 und Migrationsverhalten des Tumors unter Strahlentherapie

Kreuztabelle

Anzahl

		PD-1Immun Cut-off		Gesamt
		0	1	
95%	0	3	2	5
Bestrahlungsbereich (0/1)	1	13	0	13
Gesamt		16	2	18

		Chi-Quadrat-Tests				
		Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat Pearson	nach	5,850 ^a	1	,016		
Kontinuitätskorrektur ^b		2,501	1	,114		
Likelihood-Quotient		5,828	1	,016		
Exakter Test Fisher	nach				,065	,065
Zusammenhang linear- mit-linear		5,525	1	,019		
Anzahl der gültigen Fälle		18				

a. 3 Zellen (75,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,56.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Tabelle 32: PD-L1 Immun-Expression und Migrationsverhalten des Tumors unter Strahlentherapie (p=0,065; Exakter Test nach Fisher)

		Kreuztabelle		
Anzahl		P16		Gesamt
		0	1	
95%	0	3	1	4
Bestrahlungsbereich (0/1)	1	10	3	13
Gesamt		13	4	17

Tabelle 33: p16 und Migrationsverhalten des Tumors unter Strahlentherapie

Keiner der immunhistochemischen Marker zeigte innerhalb des Hochdosis-Bereich (Boost) anhand der Vier-Felder-Tafeln eine Signifikanz oder einen Trend hinsichtlich einer bestimmten Markerexpression.

4.3.5.2 Vier-Felder-Tafeln für Vergleich Primarius versus Rezidiv

Es wurde auch die immunhistochemische Expression des Primärtumors mit jener des Rezidiv-Tumors verglichen. Für sämtliche Marker wurden hier wieder Cut-off-Werte bei 2 gewählt (Ausnahme: PD-1 und PD-L1: 1). Damit sollte geprüft werden, ob die Strahlentherapie

signifikante Auswirkungen auf die Marker-Expression im Gewebe habe. Die geringen Fallzahlen ließen nur wenige signifikante Berechnungen zu.

Im ersten Schritt wurden die Markerexpressionen mit dem Auftreten eines Rezidivs korreliert. Dabei zeigte sich, dass eine hohe PD-1Immunzell-Expression signifikant mit der Anzahl der Rezidive korrelierte. Bei jenen Patienten mit hoher PD-1Immunzell-Expression zeigten sich signifikant weniger Rezidive.

Kreuztabelle

Anzahl

		PD-1Immun Cutoff		Gesamt
		0	1	
Rezidiv ja/nein	0	32	24	56
	1	24	6	30
Gesamt		56	30	86

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	4,493 ^a	1	,034		
Kontinuitätskorrektur ^b	3,543	1	,060		
Likelihood-Quotient	4,727	1	,030		
Exakter Test nach Fisher				,056	,028
Zusammenhang linear-mit-linear	4,441	1	,035		
Anzahl der gültigen Fälle	86				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 10,47.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Tabelle 34: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination PD-1Immun-Expression und Rezidiv (p = 0,034)

In weiterer Folge wurden jene 17 Rezidivpatienten näher analysiert, von denen immunhistochemische Färbungen angefertigt werden konnten. Für diese wurde anschließend die Markerexpression im Primärtumor mit der Markerexpression im Rezidivtumor korreliert. Dabei fand sich auch unter Betrachtung der exakten Tests nach Fisher für 2-seitige Signifikanz bei kleinen Fallzahlen keine statistische Signifikanz.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das in der Arbeit untersuchte Kollektiv bestand aus 121 Patienten mit einem mittleren Alter von 69 Jahren. Von den Patienten erkrankten innerhalb unseres Beobachtungszeitraumes 30 Patienten an einem Rezidiv. Zudem zeigten 23 Patienten positive p16-Expressionen.

In den Spearman-Korrelations-Analysen konnte ein Zusammenhang für Hif1 α mit Survivin bzw. p16, für pAkt mit CD44 sowie für Survivin mit CD44 gefunden werden. Negative p16-Expression korrelierte zudem mit Nichtraucher-Verhalten.

In den Vier-Felder-Tafeln fanden sich Korrelationen für p16 mit niedrigem histopathologischen Grading, für fehlende pAkt-Expression mit höheren Tumorstadien, sowie für HIF1 α -Expression und fehlenden Fernmetastasen.

In den Kaplan-Meier-Analysen konnte für das Gesamtüberleben eine Signifikanz für p16 sowie Trends für PD-L1 und PD-1 gefunden werden. Für das krankheitsfreie Überleben konnten lediglich Trends für PD-L1Immunzell-, und PD-1Immunzell-Expressionen gefunden werden. Für die Subgruppe der p16-negativen HNSCCs ließ sich dieser Trend für eine positive PD-L1Immunzell-Expression erneut finden.

Im anschließenden Cox-Regressions-Modell konnte sich p16 signifikant hinsichtlich des Gesamtüberlebens durchsetzen. Gerade nicht mehr signifikant zeigten sich PD-1 und PD-L1. Für das krankheitsfreie Überleben fand sich in diesem Modell für keinen der von uns untersuchten Marker eine Signifikanz.

Abschließend wurden Vier-Felder-Tafeln für die Strahlendaten und den immunhistochemischen Markern berechnet und daraus abgeleitet eine deskriptive Statistik erstellt. Trotz der geringen Fallzahlen innerhalb der Patienten mit Rezidiv, ließen sich einige Trends für pAkt, CD44, PD-L1, PD-L1Immunzell-Expression und p16 als möglichen Hinweis für das Migrationsverhalten im Bestrahlungsbereich und das Auftreten von Feldrandrezidiven erkennen. Auch die Expression von PD-1Immunzell zeigte eine Signifikanz zu geringerer Rezidiv-Neigung.

5 Diskussion

5.1 Problemstellung

Das HNSCC ist zurzeit die sechsthäufigste Tumorentität weltweit (Bose, Brockton et al. 2013). Hinsichtlich der Lokalisation wird es in vier Untergruppen (Pharynx, Larynx, Mundhöhle und Lippe) unterteilt. Eine der Hauptproblematiken der HNSCCs stellt die oft sehr späte Diagnosestellung dar. So werden HNSCCs oftmals zu einem Zeitpunkt diagnostiziert, bei dem bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium vorliegt. Trotz verbesserter Behandlungsmöglichkeiten stagniert die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit einem HNSCC, abhängig von Lokalisation und Tumorstadium bei ca. 50% (Bose, Brockton et al. 2013). Bei einer hohen Rezidivrate von nahezu 50% und einer Heilungsrate von ebenso lediglich knapp 50%, besteht ein großes Interesse an der Identifikation jener Patienten mit besonders hohem Rezidiv-Risiko. Darüber hinaus wären Prädiktoren für ein Therapieansprechen sowie neuen individualisierten Therapieoptionen für dieses Krankheitsbild wünschenswert. Die Forschungsarbeiten der letzten Jahre zeigen ein sehr heterogenes Bild der verschiedenen HNSCC-Subtypen. Für eine zielgerichtete Therapie der Tumore des Pharynx, Larynx, der Mundhöhle und der Lippe wird seit einiger Zeit versucht, anhand verschiedener Kriterien wie Alter, Geschlecht, Noxenexposition oder Expression von Biomarkern das individuelle Therapieansprechen vorherzusagen. Galten bis vor kurzem vor allem die operative Sanierung sowie die kombinierte Radio-/Chemotherapie als zentrale Therapiesäulen, wuchs in den letzten Jahren mit besserem Verständnis der molekularbiologischen Vorgänge innerhalb der HNSCCs kontinuierlich auch das Interesse an der sogenannten zielgerichteten Therapie (engl. Target-Therapy). Diese greift unter anderem bestimmte Schlüsselenzyme innerhalb des Zellzyklus an, welche für die Entstehung und das Überleben des Tumors von Bedeutung sind. Seit 2011 ist so die Anwendung von zielgerichteten Therapien von HNSCCs mittels EGFR-Inhibitoren (Cetuximab) zugelassen. Um den individuellen Therapieerfolg in Zukunft besser abschätzen zu können, ist die Suche nach immunmodulatorischen Prognose-Markern von großer Bedeutung. Zahlreiche Marker wurden bereits hinsichtlich ihrer Rolle bei der Entstehung von HNSCCs diskutiert. Spätestens seit der Keynote 024-Studie finden auch Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab beim rezidivierten oder metastasierten HNSCC ihren Einsatz (Seiwert, Burtneß et al. 2014). Obwohl im Bereich der HNSCCs verglichen mit anderen Tumorentitäten noch Optimierungsbedarf in der molekularbiologischen Therapiestratifizierung besteht, scheinen zielgerichtete Therapien vielversprechende Ansätze für jene Tumorentität darzustellen. Es bedarf allerdings noch weiterer prädikativer Marker, die eine Therapieplanung erlauben und Patientengruppen identifizieren, die von der beschriebenen Therapiemodalität profitieren können. In unserer Arbeitsgruppe wurden in der Vergangenheit bereits einige

Schlüsselenzyme untersucht. So konnten etwa Pickhard et al. 2014 in einer immunhistochemischen Studie anhand von 180 Patienten die Enzyme pAkt und Survivin als mögliche Prognosemarker identifizieren (Pickhard, Grober et al. 2014). Die beiden Enzyme wurden auch in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht und die Korrelation mit weiteren möglichen Schlüsselenzymen des Zellzyklus bzw. Signaltransduktion unternommen.

Zahlreiche Arbeiten beschäftigten sich zudem in den letzten Jahren mit dem Verhalten des Tumors unter Strahlentherapie. So konnte beim Glioblastom eine strahleninduzierte Migration der Krebszellen nachgewiesen werden, welche zu einer vermehrten Rezidivrate führte (Wild-Bode, Weller et al. 2001). Schuettler et al. konnten zudem 2015 für HNSCCs nachweisen, dass eine gezielte Blockade des EGFR-Signalweges (und folglich auch von pAkt) zu einer verminderten Migrationstendenz des Tumors führen kann (Schuettler, Piontek et al. 2015).

Die Arbeit untersucht nun basierend auf den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe erneut eine statistische Korrelation von Zellzyklusregulatoren und Immunmarkern bei HNSCCs. Zudem werden erstmalig die Markerexpressionen mit der im CT ermittelten Tumor-Lokalisation vor und nach Radiatio bzw. bei Auftreten eines Rezidivs verglichen. Ziel ist es, hierdurch Rückschlüsse zu ziehen, inwiefern gewisse Markerexpressionen zur Strahlenresistenz bzw. Strahlensensitivität beitragen könnten. Unseres Wissens ist die gewählte Methode mittels Bestimmung der Volumengröße von Primärtumor und Rezidiv aus CT-Bildern, Bestimmung der Tumor- bzw. Rezidiv-Lokalisation im Vergleich zu den Hochdosis- und Boost-Bereichen sowie anschließende Korrelation dieser Daten mit immunhistochemischer Markerexpression die erste ihrer Art dieser Größenordnung.

5.2 Erwartungen an unsere Ergebnisse

1. Mittels eines großen Patientenkollektivs sollten für HNSCCs relevante Markerkorrelationen zwischen den einzelnen Markern untersucht werden, um so mögliche Hinweise auf gehäuftes Vorkommen von Co-Expressionen zu erhalten.
2. In weiterer Folge sollten die einzelnen Markerexpressionen auch mit klinischen Daten sowie Überlebensdaten korreliert werden. Ziel war es, bereits bekannte Korrelationen zu reproduzieren und ggf. neue Korrelationen zu finden, welche eine Einordnung in spezifische Subgruppen mit eigenen Risikoprofilen und individuellen Therapiemöglichkeiten bieten könnten. Die Erstellung von Überlebenskurven sollte zusätzlich eine Aussage hinsichtlich Gesamtüberleben und krankheitsfreiem Überleben ermöglichen.
3. Die Daten sollten als Grundlage für die weitere Untersuchung von Markerkombinationen dienen, welche möglicherweise verglichen mit den bisher vorhandenen Kriterien (TNM, Noxenexpression, etc.) oder durch die jeweilige Expression der Einzelmarker eine bessere Prognoseeinschätzung ermöglicht.

4. Abschließend wollten wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine mögliche Korrelation der Markerepressionen mit CT-Daten aus der Strahlentherapie untersuchen. Die Grundidee war, dass gewisse Markerepressionen verstärkt in Zusammenhang mit Rezidivraten, Tumormigrationsverhalten und strahlenabhängigen Überlebens-Wahrscheinlichkeiten stehen könnten. Unseres Wissens ist die gewählte Methode die erste in ihrer Form und soll somit speziell für Patienten mit Rezidiven erste Rückschlüsse auf mögliche Zusammenhänge mit Markerepressionen liefern.

5.3 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Wissenschaft

Im ersten Schritt unserer Untersuchungen wurden mittels Spearman-Korrelationsanalysen Markerepressionen korreliert, die ursächlich für die Tumorentstehung und Progression sein könnten. Insgesamt ergaben sich nur wenige signifikante Korrelationen, jedoch einige sehr vielversprechende Trends. Die deutlichste Korrelation konnte innerhalb der Gruppe der Signaltransduktions-Moleküle für Hif1 α und Survivin festgestellt werden. Weitere Trends fanden sich für pAkt und CD44, bzw. Survivin und CD44. Im weiteren Verlauf wurden die Markerepressionen mit den klassischen Risikofaktoren für HNSCC (p16-Expression, Rauch-, bzw. Alkoholverhalten) korreliert. Hierbei konnte wiederum eine positive Korrelation zwischen p16-Status und Hif1 α bzw. eine negative Korrelation zum Alkoholkonsum gefunden werden. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, haben wir die Enzymmarker in verschiedene Untergruppen, entsprechend ihrer molekularen Funktion, eingeteilt. Auf die Bedeutung und Interpretation der gefundenen Korrelationen wird in den nun folgenden Unterkapiteln zu den jeweiligen Markern näher eingegangen. Darüber hinaus werden die Ergebnisse in den Stand der aktuellen Forschung eingeordnet.

5.3.1 Signaltransduktions-Marker (pAkt, Survivin, Hif1 α)

Streng genommen ist lediglich pAkt (Proteinkinase B) ein Enzym dieser Gruppe. Jedoch greifen in Tumorzellen auch Survivin (BIRC5 oder API4) und Hypoxie-Induzierter Faktor (Hif1 α) entscheidend in die Signalvermittlung innerhalb der Zellen ein, weswegen sie von uns ebenfalls in diesem Zusammenhang diskutiert werden.

Das Enzym pAkt besitzt eine zentrale Rolle in der Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse und greift auf diese Weise in die Regulation von Zellzyklus, Zellproliferation, Stoffwechsel und auch Wachstum ein. Es interagiert im phosphorylierten Zustand somit mit einer Vielzahl an Proteinen und aktiviert oder inhibiert diese (Xue and Hemmings 2013). Es ist allgemein bekannt, dass der pAkt-Signalweg in verschiedenen Krebsformen dereguliert wird. Daher wird vermutet, dass eine gezielte Blockade dieses Signalweges ein Ansatz in der Krebstherapie sein könne (Toker and Yoeli-Lerner 2006). Bislang bleiben die Ergebnisse allerdings Gegenstand kontroverser Diskussionen. Vor allem die Auswirkungen auf die

Überlebensprognose bleiben nach wie vor unklar. In einer Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen pAkt-Expression und besserem Gesamtüberleben gefunden werden (Pickhard, Grober et al. 2014).

In der Korrelation mit anderen Biomarkern bzw. weiteren klinischen Daten ergaben sich im Rahmen dieser Arbeit für pAkt nur wenige signifikante Zusammenhänge. So lässt sich lediglich ein positiver Trend zu CD44 herstellen. Das soll im Abschnitt 5.3.2 näher diskutiert werden. In der Korrelation zu den klinischen Daten findet sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen negativer pAkt-Expression und einem fortgeschrittenem Tumorstadium nach UICC (III/IV). Pickhard et al. konnten einen dazu passenden Zusammenhang zwischen erhöhter pAkt-Expression und einer verminderten Rate an Fernmetastasen (M0) sowie vice versa für verminderte pAkt-Expression eine erhöhte Rate an Fernmetastasen (M+) nachweisen (Pickhard, Grober et al. 2014). Da Letzteres wiederum zu einem erhöhten Tumorstadium nach UICC-Klassifikation beiträgt, sind unsere Ergebnisse in sich schlüssig. Dieselbe Korrelation wurde auch für die Subgruppe der p16+ Patienten durchgeführt. Aufgrund der geringen Fallzahl ließ sich jedoch lediglich ein positiver Trend zwischen niedriger pAkt-Expression und hohem Tumorstadium finden. Dennoch scheint pAkt ein möglicher Prognosefaktor für eine Fernmetastasierung und in weiterer Folge auch für fortgeschrittene Tumorstadien zu sein.

In den Kaplan-Meier-Analysen ergab sich für pAkt im Hinblick auf das OS kein signifikanter Zusammenhang. Obwohl hier keine ausreichende Signifikanz gefunden werden konnte, sprechen die Daten in Anbetracht der oben erwähnten Ergebnisse für eine mögliche Prognoserelevanz von pAkt. Pickhard et al. konnten etwa sowohl in den Kaplan-Meier-Analysen als auch in der Cox-Regression signifikante Zusammenhänge zwischen erhöhter pAkt-Expression und dem OS finden (Pickhard, Grober et al. 2014). Die Berechnungen unserer Cox-Regression konnten pAkt aufgrund fehlender Voraussetzungen, wie proportionalen Hazards aus den Kaplan-Meier-Analysen, nicht berücksichtigen. Die von uns gefundenen Ergebnisse lassen sich somit nicht nahtlos in die bestehende Literatur einordnen. So fanden beispielsweise Zhou et al. 2018 für das weibliche Mamma-Karzinom einen Zusammenhang von hoher pAkt-Expression und verkürztem OS und DFS (Zhou, Wang et al. 2018). Ähnliche Ergebnisse erhielten Murakami et al. 2018 für das Magenkarzinom. Sie brachten erhöhte pAkt-Expressionen in Zusammenhang mit verkürztem OS (Murakami, Tsujitani et al. 2007). Auch für HNSCCs konnte bereits ein Zusammenhang zwischen niedriger pAkt-Expression und besserem DFS sowie klinischer Remission gefunden werden. Allerdings war in jenem Fall die untersuchte Kohorte aus 50 Patienten mit Cetuximab vorbehandelt (Lyu, Song et al. 2016).

Angesichts der oben gefundenen Ergebnisse betrachteten wir in weiterer Folge die p16-positive Subpopulation. Dabei fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen pAkt-

Expression und OS. Diese Resultate lassen sich somit nur schwer in die bestehende Literatur einordnen. Horn et al. stellten 2017 fest, dass eine simultan hohe Expression von pAkt und p16 mit fortgeschrittenem Tumorstadium nach UICC assoziiert ist (Horn, Freudlsperger et al. 2017). Eine weitere Studie fand analog zu unseren Ergebnissen eine deutliche Überexpression von PI3K (und in weiterer Folge von pAkt) in p16-positiven HNSCCs. Jedoch konnten sie keinen signifikanten Zusammenhang dieser Expression zum OS herstellen (Kießling, Broglie et al. 2018).

Unsere gefundenen Ergebnisse zeigen teilweise eine Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, dennoch lassen sie sich nicht nahtlos in die bestehende Literatur einordnen bzw. daraus keine generellen Aussagen hinsichtlich der Prognose ableiten. Zusammenfassend liegt allerdings der Verdacht nahe, dass pAkt in Zukunft eine wichtige Rolle in der individuellen Therapieplanung für HNSCCs spielen könnte, wengleich dazu weitere großangelegte Untersuchungen nötig wären.

Als weiterer Vertreter der Signaltransduktionsmarker gehört Survivin wie bereits weiter oben erwähnt zur „Inhibitor of Apoptose Protein Familie“ (Antonia, Villegas et al. 2017). Ihm werden anti-apoptotische Eigenschaften zugeordnet, die zu aggressivem Wachstum und in weiterer Folge auch schlechtem Ansprechen auf RCTx führen können (Munscher, Prochnow et al. 2019). Zudem erfüllt Survivin weitere Aufgaben in der Zellzykluskontrolle, beispielsweise als Kontrollpunkt für korrekte Zellteilung. Fallen diese Feedbackfunktionen teilweise oder vollständig aus, kann es zu Fehlern im Zellzyklus und somit weiterer Tumorprogression führen (Mita, Mita et al. 2008). Pickhard et al. fanden heraus, dass eine verminderte Survivin-Expression mit vermindertem OS assoziiert zu sein scheint (Pickhard, Grober et al. 2014). Farnebo et al. zeigten dies 2013 ebenfalls im Umkehrschluss, indem sie eine hohe Survivin-Expression mit verbessertem OS in Zusammenhang bringen konnten (Farnebo, Tiefenbock et al. 2013). Die bisherigen Forschungsergebnisse implizieren, dass Survivin ein potenzieller Prognosemarker für Tumore allgemein und speziell auch für HNSCCs sein könnte (Waligorska-Stachura, Jankowska et al. 2012). Trotz vielversprechender Ansätze ist die endgültige Rolle von Survivin als Prognosemarker nicht restlos geklärt und wurde deswegen von uns auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Insgesamt fanden sich für Survivin unter allen Markern die meisten Korrelationen bzw. Trends in der Spearman-Korrelation. In den Vier-Felder-Tafeln zeigten sich ebenso wie in den Kaplan-Meier-Analysen jedoch keinerlei Zusammenhänge.

Im Spearman-Test wurde zunächst ein signifikanter Zusammenhang zwischen positiver Survivin- und Hif1 α -Expression festgestellt. Das ist insofern wenig überraschend, da sowohl erhöhte Hif1 α als auch Survivin-Expressionen per se mit Tumorprogression, Therapieresistenz und verschlechtertem Therapieansprechen assoziiert sind (Semenza 2000, Vaupel and Mayer

2007, Mita, Mita et al. 2008). Es wird ein kausaler Zusammenhang zwischen Survivin und Angiogenese bzw. Hypoxie innerhalb der Tumorzelle diskutiert (Sanhueza, Wehinger et al. 2015). Für Prostata-Hyperplasien wurde bereits nachgewiesen, dass der Survivin-Hif1 α -Signalweg ein besseres Zell-Überleben sowie Tumorwachstum generiert (Yun, Li et al. 2010). Dennoch steht jener Zusammenhang im Gegensatz zu der von Pickhard et al., bzw. Farnebo et al. gefundenen Auswirkung von Survivin auf das OS (Farnebo, Tiefenbock et al. 2013, Pickhard, Grober et al. 2014). Die Erkenntnisse aus anderen Arbeiten wollten wir hinsichtlich OS und DFS näher betrachten. Dazu wurden jene Patienten aus unserem Kollektiv erneut ausgewählt, welche sowohl hohe Hif1 α -, als auch hohe Survivin-Expressionen aufwiesen und für diese spezielle Gruppe erneut Überlebenskurven erstellt. Hinsichtlich des OS zeigte sich entgegen unseren Erwartungen kein signifikanter Unterschied zu jenen Patienten, die keine Expression dieser Marker zeigten. Das könnte bedeuten, dass obwohl Hif1 α zu verlängertem Zellüberleben von Tumorzellen führt, es in Kombination mit Survivin keine Einflüsse auf das OS haben dürfte. Dennoch wird beschrieben, dass Hif1 α auch zu schlechterer Chemo- und Radiosensitivität beiträgt und so ein Überleben des Tumors unter Stressbedingungen ermöglicht, indem es beispielsweise die Metabolisierungswege in der Zelle variiert (Xia, Jiang et al. 2018). Die gewonnenen Erkenntnisse werden weiter unten erneut in Bezug auf die Strahlensensitivität (Abschnitt 5.3.5) aufgegriffen.

Insgesamt können unsere Ergebnisse die Frage, inwiefern Survivin als Prognosemarker geeignet ist, nicht gänzlich beantworten. Dass für dieses Kollektiv kein Zusammenhang zwischen Survivin und der Überlebensprognose gefunden werden konnte, könnte zunächst an der vergleichsweise doch geringen Tumor-Fallzahl liegen. Ebenso sei kritisch angemerkt, dass eine Unterteilung in dichotome Ereignisse zwar statistisch oft sinnvoll ist, jedoch nie die tatsächlichen immunhistochemischen Expressionsmuster vollständig abbilden kann. Zudem ist die Auswertung einer immunhistochemischen Untersuchung stark vom Erfahrungsgrad des jeweiligen Untersuchers abhängig. Wie bereits weiter oben erwähnt, versuchten wir, diesem Problem durch eine Datenerhebung durch zwei unabhängige Auswerter entgegenzuwirken. Eine weitere mögliche Erklärung könnte unter anderem im sogenannten „Publication-Bias“ liegen. Im Zuge unserer Recherche fanden sich vorwiegend Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen Survivin und Gesamtüberleben herstellen konnten. Es gibt allerdings unserer Ansicht und Erfahrung nach auch eine hohe Dunkelziffer an Veröffentlichungen, die ebenso keinen Zusammenhang fanden und diesen in weiterer Folge auch nicht mehr diskutierten. Nichtsdestotrotz lassen sich unsere Ergebnisse für Survivin nur ungenügend in die aktuelle Literatur einordnen.

5.3.2 Krebsstammzellmarker (CD44, ALDH1)

Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine erhöhte EGFR-Expression zu einer Erhöhung der Hif1 α -Expressionen über den PI3K/pAkt-Signalweg in verschiedenen Krebsentitäten führt (Zhong, Chiles et al. 2000, Laughner, Taghavi et al. 2001, Phillips, Mestas et al. 2005). Unsere Ergebnisse konnten diesen Zusammenhang im speziellen Kontext für HNSCC nicht herstellen. Ein möglicher Grund dafür könnte die hohe Heterogenität der molekularen Tumorentstehungsprozesse sein. Bislang gibt es noch keinen molekulargenetischen Marker, der pathognomonisch für HNSCCs ist. So wird seit einigen Jahren etwa auch die Bedeutung von Krebsstammzellen und deren mögliche Rolle in der Tumorentstehung auch für HNSCCs diskutiert (Qian, Ma et al. 2015). Sie verfügen über ein hohes Migrations- und Metastasierungspotential (Ortiz, Lopes et al. 2018). Die Rolle der CSCs in Bezug auf das OS und DFS werden bislang kontrovers diskutiert. So fanden Fan et al. in einer Metaanalyse aus 27 Studien einen Zusammenhang zwischen CSCs und verschlechtertem OS und DFS, jedoch nicht für das krankheitsspezifische Überleben (DSS) (Fan, Li et al. 2017). Zwei Vertreter dieser Gruppe (CD44 als Vertreter für Oberflächenmarker und ALDH1 als Vertreter der metabolisch wirksamen CSCs) schlossen wir in unsere immunhistochemischen Betrachtungen mit ein. Zwar ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation, jedoch zeigte insbesondere CD44 auffällige Trends in Kombination mit erhöhter Survivin-Expression bzw. inverse Korrelation mit pAkt. Eben diese beiden Enzyme wurden bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe als mögliche prognostische Marker unter anderem für das OS diskutiert (Pickhard, Grober et al. 2014). Wie beschrieben zeigen CSCs (und somit auch CD44) generell vermehrtes Metastasierungspotential. Der von uns gefundene Zusammenhang zwischen positivem CD44 und negativem pAkt passt an dieser Stelle nicht ganz ins Bild. Pickhard et al. fanden 2014 eine Assoziation von positivem pAkt zu vermehrtem Auftreten von Fernmetastasen (Pickhard, Grober et al. 2014).

Ausgehend von jenen Ergebnissen wurden jene Patienten ausgewählt, die sowohl positive CD44-, als auch positive Survivin-Expressionen bzw. negative pAkt-Expressionen aufwiesen und zu einer Subpopulation zusammengefasst. Die Patientengruppe wurde dann mit jenen Patienten hinsichtlich Überlebenszeiten verglichen, die keine dieser Markerexpressionen aufwiesen. Hier konnten sich leider die gewählten Markerkombinationen nicht signifikant hinsichtlich des OS bzw. DFS durchsetzen. Es ist an dieser Stelle jedoch anzumerken, dass nur sehr wenige der insgesamt 121 Patienten sowohl positive CD44- als auch positive Survivin-Expressionen bzw. positive CD44- und gleichzeitig negative pAkt-Expressionen aufwiesen und es somit schwierig ist, in diesem Zusammenhang von statistischer Signifikanz zu sprechen. Dennoch scheint diese Markerkombination ein möglicher Ansatz im Hinblick auf die individuelle Prognoseplanung auch für HNSCCs zu sein. Abdraboah et al. fanden 2011 eine gehäufte Expression von CD44 und Survivin im weiblichen Brustkrebs vor (Abdraboah,

Gaur et al. 2011). Zudem stellten sie den Zusammenhang dieser beiden Biomarker über den PI3K-Signalweg her, der wiederum in weiterer Folge pAkt reguliert. Die Autoren brachten eine gemeinsame erhöhte Expression der drei Marker in Zusammenhang mit gehäufte Metastasierungsrate beim weiblichen Brustkrebs. Angesichts dieser Erkenntnisse versuchten wir eine Korrelation zwischen pAkt- (bzw. Hif1 α -)positiven Patienten, CD44-positiven Patienten und der Metastasierungsrate herzustellen. Leider konnte keinerlei Korrelation für diese Subpopulation gefunden werden. Inwieweit daher die Erkenntnisse aus der Literatur für verschiedene Tumortypen auf HNSCCs anwendbar sind, bleibt Gegenstand weiterer Forschung. Ein möglicher Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten wäre hier die genauere Untersuchung dieses Zusammenhanges bei einer größeren Patientengruppe sowohl mit CD44- bzw. pAkt- und/oder Survivin-Expression. Weitere Daten und Untersuchungen könnten hilfreich sein, um für diese spezielle Subpopulation ein individuelles Risiko hinsichtlich Metastasierungsrate und gegebenenfalls auch für das Gesamtüberleben bzw. die Krankheitsprogression zu erstellen.

Als weiteres vielversprechendes Enzym aus dem Bereich der Krebsstammzellmarker untersuchten wir zudem ALDH1. Bereits 2010 wurde beschrieben, dass jene Subpopulation von CSCs, die eine hohe ALDH-Expression aufwiesen, vermehrte Tumorgenität auch bei sehr kleiner Zellzahl entwickelten (Clay, Tabor et al. 2010). So wurde bereits in der Literatur vorgeschlagen, dass ALDH ein prognostischer Marker für metastasierte HNSCCs sein könnte. Eine hohe ALDH-Expression wird mit einer schlechten Prognose assoziiert (Qian, Wagner et al. 2014). ALDH wurde ebenso wie CD44 als prognostischer Marker für vermehrte Lymphknotenmetastasen vorgeschlagen (Ortiz, Lopes et al. 2018).

Unsere Ergebnisse konnten diese Zusammenhänge nicht bestätigen. Lediglich für Patienten mit positiver p16-Expression zeigte sich ein Trend zwischen hoher ALDH1-Expression und hohem histopathologischem Grading G als indirekter Hinweis einer höheren Aggressivität des Tumors durch Entdifferenzierung. Es finden sich auch ähnliche Ergebnisse in der Literatur, die eine hohe ALDH-Expression signifikant in Zusammenhang mit T4-Tumorstadium und UICC-Stadium IV bei HPV-positiven HNSCCs herstellen konnten (Gotz, Bissinger et al. 2018). Die Autoren weisen jedoch darauf hin, dass dabei eine sehr kleine Patientenzahl untersucht wurde und zur genaueren Klärung des Zusammenhanges zwischen p16 und ALDH1 weitere Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven unternommen werden müssen. Für andere Tumorentitäten, wie etwa dem Zervixkarzinom, werden Zusammenhänge zwischen negativer p16-Expression und positiver CSC-Expression und folglich schlechter Prognose beschrieben (Fu, Chuang et al. 2018). Die mangelnde Vergleichbarkeit der einzelnen Tumore hinsichtlich Lokalisation, Therapie und Therapiestadium erschwert es zusätzlich, generell geltende Aussagen abzuleiten. Bislang ist die endgültige prognostische Rolle für ALDH1 bei HNSCCs

nicht geklärt. Dennoch werden CSC-Marker als vielversprechende Ziele für zukünftige Target-Therapien intensiv untersucht werden müssen (Chen and Wang 2019, Peitzsch, Nathansen et al. 2019).

5.3.3 Immunzellmarker (PD-1, PD-L1)

Mit besserem Verständnis der zugrundeliegenden Tumor-Biologie und den komplexen Wechselwirkungen innerhalb des Tumors und mit seiner Mikroumgebung, wuchs in den letzten Jahren auch das Interesse an der Immuntherapie im Krankheitsmanagement der HNSCCs. Obwohl einzelne Subgruppen von einer Therapie dieser Checkpoint-Inhibitoren profitieren, wird sie aktuell noch im Rahmen von Studien oder zur palliativen Therapie eingesetzt. Die endgültige Rolle dieser Marker muss weiterhin untersucht werden. Zwei Vertreter jener Immunmodulatoren nahmen wir in unsere Untersuchungen mit auf: PD-1 und seinen Liganden PD-L1. Sie sind auf antigenpräsentierenden Zellen, Endothel-, sowie Epithelzellen und aktivierten Lymphozyten zu finden (Forster and Devlin 2018). Wir untersuchten im Rahmen unserer Arbeit sowohl deren Expression in Tumorzellen als auch in Immunzellen. Es ist jedoch wichtig, zwischen PD-1 und PD-L1 zu unterscheiden, da etwa nicht alle PD-1 exprimierenden Zellen PD-L1 bilden und vice versa. Für andere Krebsformen, wie etwa das Multiple Myelom, gilt eine positive PD-L1-Expression als prognostisch ungünstig hinsichtlich des Gesamtüberlebens (Guan, Wang et al. 2019).

Zunächst zeigten sich für PD-1 sowie PD-L1 sowohl für deren Expressionen im Tumorgewebe als auch in den Immunzellen keine signifikanten Korrelationen zu anderen Markern bzw. den klassischen Risikofaktoren. Jedoch korrelierte eine erhöhte Expression von PD-1/Immun signifikant mit einer verminderten Anzahl an Rezidiven.

In den Kaplan-Meier-Analysen ergab sich für hohe PD-L1-Expressionen ein Trend hin zu verlängertem OS bzw. für hohe PD-1-Expressionen ein Trend hin zu verkürztem OS. Ebenso konnten wir einen Trend im Zusammenhang zwischen hoher Expression von PD-1/Immun und verlängertem DFS finden. Derselbe Trend, wenngleich auch mit einem höheren p-Wert, ließ sich zudem für PD-L1/Immun finden.

Die vorliegenden Ergebnisse scheinen im ersten Blick widersprüchlich zur aktuellen Literatur zu sein. Da PD-L1 die Inhibierung der T-Zell-Aktivität steuert, könnte man in der Theorie vermuten, dass eine hohe Expression mit schlechtem Gesamtüberleben assoziiert sei. Zudem findet sich eine vermehrte PD-L1-Überexpression unter entzündlichen Bedingungen. Zusätzlich findet sich diese häufiger in T-Zell-reichen Tumoren (Ritprajak and Azuma 2015). In den Ergebnissen unserer Cox-Regression lässt sich der genannte Zusammenhang auch vermuten. Dabei zeigt eine positive PD-1-Expression einen Trend zu verkürztem OS und somit erhöhtem Sterberisiko, sowie eine positive PD-L1-Expression einen Trend zu verlängertem OS und somit verringertem Sterberisiko. Diese könnten somit unabhängige Prognosefaktoren

darstellen. Im Falle von PD-1 kann bei Überexpression das Sterblichkeitsrisiko um den Faktor 3 erhöht sein. In der Literatur finden sich etwa für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom vor allem für PD-L1 gegenteilige Beschreibungen. Dort scheint eine positive Expression von PD-L1 mit verminderten OS assoziiert zu sein (Pawelczyk, Piotrowska et al. 2019). Ebenso finden sich beim Magenkarzinom bzw. Ovarialkarzinom Assoziationen von erhöhter PD-L1-Expression zu vermindertem OS und damit einer schlechteren Prognose (Gu, Chen et al. 2017, Huang, Deng et al. 2018). Eine andere Studie fand für HNSCC wiederum analog zu unseren Ergebnissen eine Korrelation zwischen positiven PD-L1-Expressionen und verlängertem OS bzw. verminderter Rezidivrate (Chen, Li et al. 2019). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie hinsichtlich hoher PD-L1-Expression und verlängertem medianem Gesamtüberleben für HNSCCs gefunden (Knackstedt, Sussman et al. 2019).

Im Bereich der HNSCCs ist die aktuelle Situation und somit das Prognosepotential einer PD-L1-Expression bislang nicht eindeutig geklärt. Eine Metaanalyse von Yang et al. aus dem Jahr 2018 versuchte zu untersuchen, inwiefern die PD-L1-Expression Auswirkungen auf das Überleben bei HNSCC-Patienten hat. Sie konnten keinerlei Korrelationen zum OS feststellen, jedoch fand sich in den 29 Studien mit insgesamt über 3000 Patienten ein signifikanter Zusammenhang zwischen hoher PD-L1-Expression und längerem Progression Free Survival (PFS), welches im Wesentlichen dem von uns definierten Disease Free Survival (DFS) entspricht. Zusätzlich konnte die Forschungsgruppe das schlechteste Outcome für jene Patienten bestimmen, die eine niedrige Expression von tumor-infiltrierenden-Lymphozyten (TILs) und gleichzeitig hohe Expression von PD-1 aufwiesen (Yang, Wong et al. 2018). Schneider et al. wiederum konnten signifikante Korrelationen zwischen positiven PD-L1-Expressionen und verkürztem OS bzw. DFS für OSCC-Patienten finden. Interessanterweise stellten sie zusätzlich fest, dass die PD-1-Expression in den tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) signifikant mit einem verbessertem OS sowie DFS korreliert (Schneider, Kadletz et al. 2018). Auch der von uns gefundene signifikante Zusammenhang zwischen positiver Expression von PD-1Immun und einer verminderten Anzahl an Rezidiven belegen dies. Jene Ergebnisse passen somit recht gut zu den von uns gefundenen Ergebnissen für positive PD-L1Immun, bzw. PD-1Immun-Expressionen, welche in den Kaplan-Meier-Analysen beide zu verlängertem DFS tendierten.

Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse einer weiteren Studie gestützt, welche eine PD-L1-Expression speziell in den Immunzellen mit einer besseren Prognose im Vergleich zu einer Expression in den Tumorzellen korrelieren (Sato, Ono et al. 2019). Jene Studie untersuchte auch den möglichen Zusammenhang zwischen einer p16-Expression als Surrogatparameter für eine HPV-Infektion und der PD-L1-Expression. Dabei fanden sie sowohl ein verlängertes OS als auch ein verlängertes PFS bei gleichzeitiger Expression von p16 und PD-L1 (Sato, Ono et al. 2019). Die bereits oben erwähnte Studie von Schneider et al.

konnte lediglich für p16-negative und gleichzeitig PD-1-positive TILs eine Signifikanz zu verlängertem OS und DFS herstellen. Wir konnten wiederum verlängertes DFS für positive PD-L1-Immuno-Expression, was der Expression in den TILs gleichgesetzt werden kann, feststellen. Die geringen Fallzahlen von n=30 für p16-positiv bzw. n=50 für p16-negativ limitieren jedoch die Aussagekraft. Dennoch scheint ein möglicher prognostischer Zusammenhang bei Co-Expression von p16 und PD-L1 zu bestehen und insbesondere die PD-1 Expression in den TILs als unabhängiger prognostischer Marker Potential zu besitzen (Schneider, Kadletz et al. 2018). Größer angelegte Studien mit Untersuchung der Subpopulationen von p16-positiven und p16-negativen Patienten werden definitiv benötigt, um die Auswirkungen des Effektes zu quantifizieren.

Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2019 merkt zudem kritisch an, dass eine quantitative Vergleichbarkeit von PD-1/PD-L1 Protein-Expressionen in Tumorproben verschiedener Studien nach wie vor aufgrund technischer Probleme, wie etwa der Verwendung unterschiedlicher Immuno-Assays und Antikörper, verschiedener Tumorarten, der Variabilität der Cut-Off-Werte, sowie der nach wie vor fehlenden standardisierten Scoring-Methoden begrenzt sind (Economopoulou, de Bree et al. 2019).

5.3.4 Humanes Papilloma Virus (P16)

HPV-Infektionen gelten neben Alkohol- und Tabakkonsum als die derzeit bedeutendsten Risikofaktoren für die Entstehung von HNSCCs. Der Anteil an HPV-positiven HNSCCs nahm in den letzten Jahren kontinuierlich zu (Kobayashi, Hisamatsu et al. 2018). Mittlerweile stehen zahlreiche Möglichkeiten zur Verfügung, um den HPV-Status nachzuweisen (bspw. PCR, real-time PCR, in-situ Hybridisierung, und Serum-Antikörper Assays, Liquid-Biopsien). Als Goldstandard gilt heute die HPV E6/E7 mRNA-Identifikation basierend auf DNA-Protein-Expression in Kombination mit immunhistochemischen p16-Nachweis. Für die klinische Einschätzung ist aber oft ein immunhistochemischer Nachweis von p16 ausreichend (Sensitivität: 100%, Spezifität 79%) (Fakhry, Westra et al. 2008). Dieser gilt als Surrogatparameter für eine HPV-Infektion (Kobayashi, Hisamatsu et al. 2018). Zudem stellt er eine einfach zu implementierende und kostengünstigere Methode dar und wurde nicht zuletzt deswegen auch von uns angewandt. Allgemein bekannt ist, dass HPV-positive HNSCCs ein signifikant besseres Ansprechen auf Strahlentherapie zeigen und so möglicherweise eine direkte Auswirkung auf das Überleben aufweisen. Stellvertretend für viele weitere Studien seien jene Ergebnisse von Fakhry et al. aus dem Jahr 2008 genannt: Sie konnten ein signifikant besseres OS (84% versus 57%) und DFS (95% vs. 62%) sowie eine signifikant bessere Prognose für HPV-positiv im Vergleich zu HPV-negativen Patienten in einer großangelegten retrospektiven Studie finden (Fakhry, Westra et al. 2008). Es liegt damit also nahe, dass HPV-positive HNSCCs eine eigene Tumorentität innerhalb der HNSCCs

darstellen, welche sich unter anderem in Therapieansatz und Prognose unterscheidet (Marur, D'Souza et al. 2010). Mittlerweile sieht auch die UICC-Klassifikation eine klare Unterscheidung zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Oropharynx-Karzinomen vor (Hoffmann and Tribius 2018).

Auch in anderen Tumor-Entitäten spielt HPV eine Rolle, beispielsweise bei Zervixkarzinomen (Walboomers, Jacobs et al. 1999). Ebenso scheint p16 etwa eine Interaktion mit Hif1 α zu zeigen, welche sich in erhöhter VEGF-Expression, etwa beim weiblichen Brustkrebs äußert (Zhang, Lu et al. 2010). Diesen möglichen Zusammenhang konnten wir mit unseren Ergebnissen untermauern. P16-positive Expressionen zeigten einen vermehrten Zusammenhang mit positiven Hif1 α -Expressionen. Dennoch scheint nach wie vor kein eindeutiger kausaler Zusammenhang zu bestehen. So fanden etwa Hong et al. 2013 keine klare Assoziation von p16-Expression und Hif1 α in HNSCCs. Eher zeigten jene Patienten das schlechteste Outcome, bei denen p16 nicht exprimiert war, Hif1 α jedoch deutlich positiv ausfiel (Hong, Zhang et al. 2013). Das bestätigt wiederum das bereits weiter oben erwähnte schlechtere Überleben für HPV-negative Patienten. Allgemein bekannt ist, dass sich p16-positive Tumore meist in lokal begrenztem T-Stadium (T1/2), oft in Verbindung mit Lymphknotenmetastasen (N+) präsentieren (Spector, Gallagher et al. 2014). Aufgrund unterschiedlicher Pathomechanismen weisen sie jedoch ein besseres Ansprechen auf Radiochemotherapie und somit ein besseres Überleben auf (Ang, Harris et al. 2010).

Für Patienten ohne p16-Expression fanden wir eine Korrelation zu niedrigem histopathologischen Grading. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Studien (Nauta, Rietbergen et al. 2018, Mendelsohn, 2010). Die genauen Gründe für dieses Verhalten sind bislang noch nicht vollständig geklärt. In weiterer Folge sollte man die Gruppe p16-negativer Tumore, eventuell in Kombination mit weiteren Markerexpressionen, eine dem daraus entstehenden Risikoprofil adaptierte Therapie zukommen lassen, um einen aggressiven Verlauf frühzeitig abzuwenden. So könnte durch Vorselektion jener Patienten, die p16-negative Expressionen und gleichzeitig negative Hif1 α -Expressionen aufweisen, eine spezielle Subgruppe für lokal wenig differenzierte und nicht metastasierte HNSCCs gebildet werden. Das würde eventuell eine maßgeschneiderte Therapie ermöglichen und könnte in weiterer Folge das OS und DFS auch für HPV-negative Patienten deutlich aufwerten. Zudem könnte es den Vorteil bieten, dass nicht betroffenes Gewebe nicht mehr als nötig beschädigt und somit die Nebenwirkungsrate gesenkt würde. Erste Ansätze einer Target-Therapie in diesem Bereich wurden bereits in der Literatur beschrieben. So konnte durch gezielte medikamentöse Blockade von mTOR die Hif1 α -Expression in p16-negativen Tumoren reduziert werden, während sie zeitgleich bei p16-positiven anstieg (Kramer, Polit et al. 2018). Tumor-Hypoxie wiederum ist mit vermehrt auftretenden Fernmetastasen und schlechterem Ansprechen auf Radiochemotherapie assoziiert. Eine Schlussfolgerung daraus wäre, dass

eine vermehrte Gefäßbildung durch den VEGF (und folglich auch Hif1 α -Signalweg) mittels hämatogener Streuung zu vermehrter Metastasenbildung führt. Auch in der Literatur werden dazu die möglicherweise individualisierten Behandlungsstrategien für HNSCC mit übermäßiger Expression von Hypoxie-Markern diskutiert (Swartz, Pothen et al. 2015). Trotz besserem Verständnis der molekularbiologischen Abläufe wird der endgültige Zusammenhang zwischen Tumorhypoxie und HPV-Infektion in HNSCCs noch immer nicht in seiner Gesamtheit verstanden. Auch unsere immunhistochemische Untersuchung ermöglicht keine klare Antwort in Bezug auf diese Fragestellung.

5.3.5 Untersuchung der Feldrand-Rezidive

Ein weiterer elementarer Teil der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Feldrandrezidive bei Patienten, die ein Tumorrezidiv erlitten. Von den 30 Patienten mit Lokalrezidiv waren auf 13 immunhistochemischen Tumor-Blöcken kein ausreichend großes zur Auswertung geeignetes Tumormaterial mehr vorhanden. Versuche, jene Blöcke zu färben und auszuwerten, schlugen somit fehl. Schlussendlich konnten unsere Untersuchungen mit 17 Rezidivpatienten durchgeführt werden. Daher war es unmöglich, eine statistische Signifikanz zu erreichen, da die Strichprobenanzahl zu gering war. Sämtliche Ergebnisse dieses Abschnittes beruhen somit auf rein deskriptiven Beschreibungen. Trotz dieser Umstände lassen sich unserer Meinung anhand der geringen Fallzahlen erste Erkenntnisse ableiten, wenngleich Berechnungen mit größeren Patientenkollektiven notwendig sein werden. Insgesamt lassen sich für pAkt, Survivin, PD-L1 und p16 Assoziationen zum Migrationsverhalten des Tumors unter Strahlentherapie vermuten. Geringe Migrationstendenz bedeutete in unseren Berechnungen ein Auftreten des Rezidivs innerhalb des Boost. Umgekehrt wurde in diesem Zusammenhang von hoher Migrationstendenz gesprochen, wenn das Rezidiv außerhalb des Boost auftrat. Unserer Meinung nach kann das dann passieren, wenn der Tumor spezielle Eigenschaften besitzt, mit denen er sich der ionisierenden Strahlung entziehen kann. Nach unserer Theorie könnten die von uns gewählten Enzyme eine zentrale Rolle spielen. So wäre es möglich, dass der Tumor durch die vermehrte/verminderte Expression dieser Marker Mechanismen entwickelt, die ihm mehr Widerstand gegen die Strahlung ermöglichen. Ebenso könnten Rezidive durch Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften hervorgerufen werden. Die genannten Annahmen beruhen auf der Arbeit von Schuettler et al., die eine Abnahme der Migrationstendenz des Tumors nach gezielter Blockade des pAkt-Signalweges nachweisen konnten (Schuettler, Piontek et al. 2015).

In der Vergangenheit wurde immer wieder die Rolle von pAkt in Zusammenhang mit Strahlenresistenz diskutiert. So wurde etwa für Zervixkarzinome ein erhöhter Strahlenwiderstand bei erhöhter pAkt-Expression gefunden (Kim, Lee et al. 2006). Auch wenn

unsere Ergebnisse zum Verhalten unter Strahlentherapie aufgrund der sehr geringen Fallzahl keine signifikanten Ergebnisse zuließen, gibt es erste Hinweise, dass eine niedrige pAkt-Expression mit verringertem Migrationspotential des Tumors einhergeht. Bei den Patienten dieses Kollektives tauchte das Rezidiv gehäuft im Hochdosis-Bestrahlungsbereich des Ursprungstumors auf, was für eine geringe Migrationstendenz des Ursprungstumors unter Strahlentherapie und oxidativem Stress sprechen könnte. Das stützt weitestgehend die von Schuettler et al. gefundenen Ergebnisse (Schuettler, Piontek et al. 2015). Eine Studie schlägt zudem für das Prostata-Karzinom vor, dass durch gezielte Blockade des pAkt-Signalweges unter Radiotherapie der Strahlenresistenz entgegengewirkt werden könnte (Chang, Graham et al. 2014). Unsere Ergebnisse unterstützen diese Thesen in ersten Ansätzen. Zunächst ließ sich keine Überexpression von pAkt in den Rezidiven finden. Bei jenen Rezidiven, die aber eine niedrige pAkt-Expression aufwiesen, traten sämtliche Rezidive innerhalb des Hochdosisbereichs bzw. PTV auf. Dies lässt eine geringere Migrationstendenz und folglich verbesserte Bestrahlungsmöglichkeit vermuten. Folglich könnten größere Bereiche des Tumors angegriffen und zerstört werden und dies könnte insgesamt zu einer besseren Behandlung für den Patienten und folglich zu einem besseren Überleben führen. Die Theorie stützt umgekehrt auch die von Pickhard et al. aufgestellte Annahme, dass eine erhöhte pAkt-Expression mit einem schnell wachsenden und wenig strahlensensitiven Tumor einhergehen könnte, was wiederum zu vermehrter strahleninduzierter Migration und erhöhter Rezidivrate führen könnte (Pickhard, Margraf et al. 2011).

Jene Tumore, die eine hohe Survivin-Expression aufwiesen, entwickelten unter Strahlentherapie nur ein geringes Potential, aus dem Hochdosis-Bestrahlungsbereich zu emigrieren. Wie bereits erwähnt ist eine hohe Survivin-Expression aufgrund ihrer anti-apoptischen Eigenschaften mit aggressiverem Tumorwachstum sowie Therapieresistenzen assoziiert (Mita, Mita et al. 2008). Der Verdacht liegt also nahe, dass die Survivin-Expression eine Auswirkung auf das Verhalten des Tumors unter Strahlentherapie haben könnte. In der Literatur ist diese Rolle noch nicht eindeutig geklärt. Eine Studie von Khan et al. fand bereits 2010 heraus, dass sich die Erfolgsrate der Strahlentherapie deutlich besserte, wenn jene Tumore mit hoher Survivin-Expression zuvor mit Cisplatin vorbehandelt wurden (Khan, Khan et al. 2010). Farnebo et al. konnten 2013 bei HNSCCs ein signifikant besseres OS für jene Patienten finden, die eine hohe Survivin-Expression aufwiesen. Zudem konnten sie für zwei Zelllinien zeigen, dass eine Herabregulation von Survivin mittels siRNA die Strahlensensitivität signifikant herabsetzte (Farnebo, Tiefenbock et al. 2013). Vor allem letztere Beobachtung lässt sich mit den von uns gefundenen Ergebnissen vereinbaren. Anhand unserer Ergebnisse lässt sich vermuten, dass eine hohe Survivin-Expression mit geringerer Migrationstendenz des Tumors zusammenhängen könnte.

Auch für den Immunmarker PD-1 geben unsere Ergebnisse Hinweise auf ein geringeres Migrationsverhalten. Dies deutet sich auch in den Kaplan-Meier-Analysen an, die ein besseres OS für Patienten mit erhöhten PD-1/PD-L1-Expressionen vermuten lassen. Eine Studie von Lyu et al. aus dem Jahr 2019 konnte ebenfalls für jene Patienten mit hoher PD-1/PD-L1 Expression eine vermehrte Radiosensitivität nachweisen, welches gleichermaßen auch das DFS verbesserte, ähnlich zu unseren Ergebnissen (Lyu, Zhang et al. 2019). Eine weitere Studie konnte kürzlich beweisen, dass eine bewusste Herabregulierung von PD-L1 zur Apoptose der Tumorzelle führte, was wiederum in besseren Überlebensraten für die betroffenen Patienten resultierte (Schulz, Stancev et al. 2019). Die beiden Studien unterstützen auch die von uns gefundenen Ergebnisse. Prolongiertes stationäres Verhalten des Tumors erhöht die Strahlensensitivität und könnte so in weiterer Folge zu besseren Überlebensraten beitragen. Einige Studien schlagen nun vor, dass eine Kombination von Strahlentherapie und gleichzeitig gezielter Blockade von PD-1/PD-L1 für bestimmte Patientengruppen von Vorteil sein könnte (Guram, Sanders et al. 2018, Oweida, Hararah et al. 2018).

Allgemein bekannt ist derzeit, dass jene Patienten mit positiver p16-Expression ein besseres Ansprechen auf Bestrahlung und somit eine bessere Prognose aufweisen. Zwar werden einige Signalwege diskutiert, die für jene Prozesse verantwortlich sind, die genauen Mechanismen dahinter sind allerdings bis heute nicht bekannt. Beispielsweise werden die unterschiedliche Anzahl an Genexpressionsprofilen für die bessere Antwort auf Bestrahlung bei p16-positiven HNSCCs diskutiert (Zhang, Mirani et al. 2014). Weitere Gründe werden in der Alteration der DNA-Reparatur, zellulärer Immunantwort, sowie Verminderungen der hypoxischen Regionen rund um den Tumor gesehen (Liu, Mann et al. 2018). Als zentrales Molekül wird allerdings die Expression von p53 betrachtet, welche in p16-positiven Tumoren verstärkt exprimiert, wohingegen sie bei p16-negativen Tumoren supprimiert wird. Diese Eigenschaft von p16-positiven HNSCCs erlaubt es mittels der Restfunktion von p53 die Tumorzelle in einen Zellzyklusarrest zu führen und in weiterer Folge der Apoptose zuzuführen, wenn die durch die Strahlentherapie erzeugten Doppelstrangbrüche ein gewisses Ausmaß annehmen (Ziemann, Arenz et al. 2015). Unsere Ergebnisse lassen sich leider nicht analog zur bestehenden Literatur einordnen. Wie bereits für andere Biomarker argumentiert, würde ein geringes Migrationsverhalten eines Tumors unter Strahlentherapie dazu führen, dass dieser länger stationär verharrt und somit während der Bestrahlung effektiver bestrahlt werden könnte. In der Theorie müsste das folglich zu einem besseren Therapieanspruch des jeweiligen Patienten führen. Anstatt für p16-negative Tumore wäre unsere Annahme für p16-positive Tumore besser passend, analog zu den Resultaten für andere Enzyme (siehe oben). Eine mögliche Erklärung wäre, dass p16-positive Tumore als weniger hypoxisch im Vergleich zu p16-negativen Tumoren gelten (Barker, Paget et al. 2015). Durch die vermehrt vorhandenen

Sauerstoffradikale bei p16-positiven Tumoren steigt die Effektivität der Bestrahlung, was zu einem besseren Ansprechen auf Strahlentherapie führen könnte (Liu, Mann et al. 2018).

Abschließend untersuchten wir die Enzymexpressionen im Primärtumor mit jenen in den Rezidiven. Leider ließen die geringen Fallzahlen keine signifikanten Berechnungen zu. Folglich war keinerlei Aussage darüber möglich, ob sich die Markerexpression durch die Bestrahlung verändert bzw. ob sich diese von Prä-Radiatio zu Post-Radiatio verändert. Die Untersuchung mit der von uns gewählten Methode wurde unseres Wissens bislang noch nicht angewendet und somit ist hier auch eine Einordnung in die Literatur schwierig.

Zusammenfassend lässt sich zur Untersuchung der Feldrandrezidive Folgendes feststellen:

1. Die meisten der hier untersuchten Rezidive traten in unmittelbarer Nähe des Ursprungstumors auf.
2. Hohe Markerexpressionen sind nicht automatisch mit stationärem Tumorverhalten (niedrigem Migrationsverhalten) assoziiert.
3. Gewisse Marker könnten eine molekularbiologische Fähigkeit des Tumors begünstigen, sich der Strahlung zu entziehen.
4. Wie die genauen Wirkungsweisen sein könnten, muss mittels anderer Versuchsaufbauten (Immuno-Assays, etc.) standardisiert untersucht werden. Denkbar wäre beispielsweise auch eine sogenanntes „Mapping“ der Mikroumgebung der Feldgrenzen. Durch exakte Bestimmung der Enzymexpressionen knapp innerhalb der Feldgrenzen, an den Feldgrenzen selbst und knapp außerhalb der Feldgrenzen könnten maßgeschneiderte Profile dieser Expressionen erstellt werden und als Folge exaktere Aussagen zu ihrer Rolle in der Tumormigration getroffen werden. Zudem könnte dadurch unbeschädigtes Gewebe vor unnötiger Strahlung geschont und unter Umständen auch ein besserer Therapieanspruch für den Patienten erreicht werden.
5. Sicherlich muss auch die Rolle der klassischen Risikofaktoren (Alkohol, Nikotin, HPV) für das Entstehen von Rezidiven und somit deren Auswirkung auf das Migrationsverhalten des Tumors untersucht werden. Als Beispiel könnte eine Non-Compliance des Rezidivpatienten genannt werden, der trotz initialer Heilung sein Risikoverhalten nicht verändert hat. Rauchen fördert in diesem Fall auch an der Stelle des Primärtumors die Hypoxie im Gewebe und könnte so zu einem rascheren Auftreten eines Rezidivs führen. Nichtsdestotrotz ist das Noxenverhalten lediglich ein Parameter von vielen (z.B. außerdem: Feldkanzerisierung, Zweit- und Dritttumore unabhängig vom Primärtumor vor allem bei Komorbiditäten etc.) im Entstehungsprozesses eines Rezidivs. Somit ist eine Untersuchung auf molekularbiologischer Ebene trotzdem weiterhin in Relation zur klinischen Beurteilung des Patienten im Sinne einer ganzheitlichen Therapie zu sehen.

6. Zu sämtlichen in diesen Abschnitt gefundenen Ergebnissen sei nochmals explizit darauf hingewiesen, dass diese auf rein deskriptiver Statistik beruhen und somit keine allgemeinen Aussagen zulassen. Dieser Abschnitt ist lediglich als Vorarbeit und erster Versuch einer Einordnung zu sehen. Die wenigen untersuchten Rezidive und auch die bisher sehr spärliche Literatur in diesem Feld bedürfen mit Sicherheit weiterer großangelegter prospektiver Studien mit einem größeren Patientenkollektiv unter standardisierten Bedingungen.

5.3.6 Probleme

Im Rahmen unserer umfangreichen Untersuchungen ergaben sich naturgemäß auch eine Reihe von Problemen, die im folgenden Teil angesprochen werden.

Zu Beginn ist anzuführen, dass für jede Untersuchung einer großen Menge an Markern auch eine große Fallzahl nötig ist. In unserem Fall wurden über einen Beobachtungszeitraum von 10 Jahren 121 Patienten, die allesamt dieselben Therapieoptionen bekommen haben, miteingeschlossen. Die tatsächliche Anzahl jener Patienten, die in unsere Betrachtung miteingeschlossen werden konnten, war jedoch deutlich geringer. Das war zumeist der Tatsache geschuldet, dass einige Fälle aufgrund eines fehlenden Ereignisses (Therapieverweigerung, inoperabel, Tumorgewebeblock nicht verwertbar) aus dem Testverfahren ausgeschlossen werden mussten. Die Wahrscheinlichkeit für das Fehlen eines Ergebnisses steigt naturgemäß mit der Anzahl der untersuchten Marker. Trotz standardisierter Färbemethoden waren einige Gewebeproben nicht beurteilbar. Die Patienten mussten dann für sämtliche Betrachtungen aus den Berechnungen genommen werden. In manchen Fällen war nicht mehr ausreichend Tumormaterial auf den Paraffinblöcken vorhanden. Somit mussten auch sie komplett aus der Betrachtung genommen werden, was die Fallzahlen und die statistische Aussagekraft von Beginn an beeinflusste, insbesondere bei der Subgruppe der Patienten mit Lokalrezidiv.

Besonders deutlich wird dies bei den ermittelten Cox-Regressionen im Anschluss an die Kaplan Meier Analysen. Wie bereits erwähnt erfüllten unsere Berechnungen hinsichtlich DFS aufgrund der zu geringen Anzahl an Fällen und der zu geringen Anzahl an Ereignissen die Voraussetzung für die Durchführung dieser Berechnung nicht bzw. nur teilweise.

Anzumerken ist auch, dass immunhistochemische Arbeiten allein keine kausalen Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Markern herstellen können. Eine Korrelation zweier Marker ist nicht gleichbedeutend mit einer kausalen Verbindung untereinander. Solche statistischen Korrelationen können lediglich als ein orientierendes Screening verstanden werden. Hier gelangen wir auch zu einem der Hauptkritikpunkte die der immunhistochemischen Auswertung vorgeworfen werden: Diese Methode wird oft für ihre Subjektivität des Auswertungsverfahrens ohne Standardisierung kritisiert (Kim, Roh et al.

2016). Zudem lässt sie nur schwer eine quantitative Analyse zu. Um der genannten Problematik entgegenzuwirken, verwendeten wir für die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte ein spezielles Scoring-System, welches innerhalb unserer Arbeitsgruppe bereits für vorhergehende Arbeiten verwendet wurde (Pickhard, Grober et al. 2014). Indem zusätzlich unsere Auswertung von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt wurde und darüber hinaus die Expressions-Scores mittels Cut-off-Werten in dichotome Ereignisse (positiv vs. negative Expression) umgewandelt wurden, konnten wir somit das Problem der Subjektivität weitestgehend beseitigen. Allerdings ist uns bewusst, dass durch die Einführung von Cut-Off-Werten Information über Ausprägung und Intensität von Färbungen in ihrer Gesamtheit verloren geht. Zudem gibt es bislang keine allgemein gültigen Scores, die von unterschiedlichen Arbeitsgruppen gleichermaßen angewandt werden. Alle Faktoren erschweren es, einheitliche Studiendesigns zu kreieren und erklären zum Teil auch, warum bislang keine allgemein anerkannten Biomarker im Bereich der HNSCCs gefunden werden konnten (Economopoulou, de Bree et al. 2019). Sicherlich wäre ein standardisiertes Vorgehen im Sinne von Therapiestandards, standardisierten Probeentnahmen sowie im Bereich der Immunhistochemie standardisierte Vorbereitungs- und Färbeprotokolle dringend nötig. Die große Anzahl an Veröffentlichungen in diesem Forschungsgebiet mit bislang noch sehr heterogenen Studienergebnissen aus zumeist retrospektiven Arbeiten zeigen aber das klare Interesse an einer Biomarker-gerichteten Diagnose- und Therapieform.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Kollektiv nur bedingt geeignet war, um generelle Rückschlüsse auf die Tumorgenese bei HNSCCs zu erhalten. Es wird einer größeren Zahl an prospektiven Studien bedürfen, welche eine bessere Vereinheitlichung zulassen werden.

6 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCCs) sind zurzeit die sechsthäufigste Tumor-Entität weltweit mit etwa 500.000 Fällen pro Jahr. Trotz besserem Verständnis der molekularbiologischen Vorgänge und daraus resultierenden Optimierungen in den Therapiemöglichkeiten stagniert die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 50% (Bose, Brockton et al. 2013). Bislang galten klassische Risikofaktoren wie Rauch- und Alkohol-Verhalten, eine mögliche HPV-Infektion oder auch die TNM-Klassifikation als erste Prognosefaktoren. In den vergangenen Jahren wuchs jedoch das Interesse an Vorgängen, welche auf molekularer Ebene für die Onkogenese der HNSCCs verantwortlich sein könnten (Target Therapie). So traten vor allem Enzyme der Signaltransduktion sowie der Zellzyklusregulation ins Zentrum des Forschungsinteresses. Ziel ist eine bei Diagnosestellung bessere Einordnung der Patienten in individuelle Risikoprofil-Gruppen zu ermöglichen und somit eine maßgeschneiderte Tumortherapie einleiten zu können.

Basierend auf Vorarbeiten wurden potenzielle Biomarker hinsichtlich Prognose-tauglichkeit untersucht und in weiterer Folge mit CT-basiert gemessenem Tumolvolumen korreliert, um Informationen über mögliche Biomarker-Expressionen und deren Rolle in der strahleninduzierten Migration an den Feldgrenzen von Rezidiven zu erhalten. Wir untersuchten an einem Patientenkollektiv von 121 HNSCC-Patienten mittels IHC die Expressionsmuster von acht Biomarkern (pAkt, Survivin, Hif1 α , CD44, ALDH1, PD-1, PD-L1, p16), denen eine potenzielle Rolle in der Onkogenese zugeschrieben wird. Die Ergebnisse wurden mit klinischen Charakteristika korreliert und statistisch ausgewertet.

Dabei konnten im ersten Schritt einige signifikante Korrelationen der Marker untereinander gefunden werden, insbesondere Hif1 α und Survivin. Ebenso konnten wir Zusammenhänge zwischen Markerexpressionen und klinischen Parametern finden. So war eine negative p16-Expression im Tumorgewebe mit einem niedrigen histopathologischen Grading signifikant assoziiert. Für Patienten mit negativer pAkt-Expression lag ein signifikanter Zusammenhang zu höheren Tumorstadien vor. Ebenfalls auffällig war in diesem Zusammenhang die Tendenz zwischen positiver Hif1 α -Expression und dem vermehrten Auftreten von Fernmetastasen. Für die spezielle Entität der p16-positiven HNSCCs ergaben sich auffällige Tendenzen für positive ALDH1-Expressionen und hohem histopathologischen Grading sowie negativer pAkt-Expression und hohem Tumorstadium.

In den Kaplan-Meier-Analysen konnte für das Gesamtüberleben eine Signifikanz für p16 sowie Tendenzen für PD-1 und PD-L1 gefunden werden. Für das krankheitsfreie Überleben konnten lediglich Tendenzen für PD-1Immun-, und PD-L1Immun-Expressionen gefunden werden. Für die Subgruppe der p16-negativen HNSCCs ließ sich dieser Trend für eine erhöhte PD-

L1Immun-Expression erneut finden. Im anschließenden Cox-Regressions-Modell konnte sich p16 signifikant hinsichtlich Gesamtüberleben durchsetzen.

Im Rahmen der Untersuchungen der Feldrandrezidive ergaben sich trotz geringer Fallzahlen aufbauend auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe erste auffällige Tendenzen für pAkt, Survivin, PD-1 sowie p16 für deren Auswirkung auf strahleninduzierte Migration.

In den letzten Jahren zeichnete sich im Bereich der HNSCCs bereits ab, dass es schwer werden wird, einzelne molekulare Prognosemarker herauszufiltern. Auch die Kombination aus mehreren Markern blieb bisher aufgrund der sehr heterogenen Onkogenese weitestgehend erfolglos. Erwartungsgemäß reihen sich auch die Ergebnisse unserer Arbeit in den allgemeinen Tenor ein. Dennoch finden sich einige interessante Zusammenhänge, welche das Prognosepotential der von uns untersuchten Marker erkennen lassen. Insbesondere die Immunzell-Marker PD-1 und PD-L1 scheinen hier großes prognostisches Potential zu besitzen.

Auch die von uns erstmalig durchgeführte Korrelation von Enzymexpressionen und CT-basierten Volumengrößen aus der Strahlentherapie zur Untersuchung der Feldrandrezidive bringt erste Aufschlüsse über die möglichen Rollen der einzelnen Marker. Sicherlich ist hier allerdings noch eine genauere Betrachtung der Mikroumgebung an und um die Feldgrenzen mittels geeigneter Methoden nötig. Beispielsweise könnte ein sogenanntes „Mapping“ im Bereich der Feldgrenzen erfolgen, in dem Enzymexpressionen knapp innerhalb der Feldgrenzen, direkt an den Feldgrenzen sowie knapp außerhalb der Feldgrenzen bestimmt werden.

Unsere Arbeit stellt somit einen weiteren Schritt in der molekularbiologischen Charakterisierung der HNSCCs auf dem Weg zu individueller Therapie-, Prognose- und Risikostratifizierung dar. Zur genaueren Evaluierung der von uns gefundenen Daten und deren klinischer Anwendung wird es allerdings nötig sein, die gefundenen Ergebnisse anhand größerer Patientenkollektive unter standardisierten Bedingungen weiter zu überprüfen.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Hypothetisches Model für die Entstehung von HNSCC (Califano, van der Riet et al. 1996).....	21
Abbildung 2: Überblick über den PI3K/Akt Signalweg (West, Castillo et al. 2002).....	26
Abbildung 3: Rolle von Survivin in der Apoptose (Athanasoula, Gogas et al. 2014).....	30
Abbildung 4: Die physiologischen Funktionen von CD44 (Swain, Routray et al. 2017)	32
Abbildung 5: Mögliche Rolle von CD44 in Krebsstammzellen (Swain, Routray et al. 2017)..	33
Abbildung 6: Steuerung und Funktion von ALDH1 in CSCs (Xu, Chai et al. 2015)	35
Abbildung 7: Der Krebs-Immun Zyklus (Chen and Mellman 2013).....	36
Abbildung 8: Monoklonale Antikörper gegen wichtige inhibitorische Immuno-Checkpoints (Forster and Devlin 2018).....	38
Abbildung 9: Signalwege der high-risk HPV Onkogene (Kobayashi, Hisamatsu et al. 2018)	40
Abbildung 10: Mechanismen, die zur erhöhten Strahlensensitivität bei HPV-positiven HNSCCs beitragen können (Gottgens, Ostheimer et al. 2018)	41
Abbildung 11: Schema der erhobenen Fusionsbilder aus Ursprungs-CT und Rezidiv-CT-Bildern.....	52
Abbildung 12: Detailaufnahme-Schema zur Rezidiv-Volumenbestimmung an den Feldgrenzen	52
Abbildung 13: Detailaufnahme-Schema zur Rezidiv-Volumenbestimmung außerhalb der Feldgrenzen („out of field“).....	53
Abbildung 14: Immunhistochemische Darstellung von pAKT im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts).....	58
Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung von Survivin im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts).....	59
Abbildung 16: Immunhistochemische Darstellung von Hif1 α im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts).....	59
Abbildung 17: Immunhistochemische Darstellung von CD44 im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts).....	59
Abbildung 18: Immunhistochemische Darstellung von ALDH1 im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts).....	59

Abbildung 19: Immunhistochemische Darstellung von PD-1 im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts).....	59
Abbildung 20: Immunhistochemische Darstellung von PD-L1 im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts).....	60
Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung von PD-1Immun im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 10x (von links nach rechts).....	60
Abbildung 22: Immunhistochemische Darstellung von PD-L1Immun im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts).....	60
Abbildung 23: Immunhistochemische Darstellung von p16 im Tumorgewebe a) positive Expression 10x b) positive Expression 20x c) negative Expression 20x (von links nach rechts).....	60
Abbildung 24: Überlebenskurve für p16 (p=0,014; n=80)	70
Abbildung 25: Überlebenskurve für PD-L1 (p=0,083; n=75; nicht signifikant).....	71
Abbildung 26: Überlebenskurve für PD-1 (p=0,091; n=75; nicht signifikant).....	71
Abbildung 27: Überlebenskurve für p16-positive HNSCCs und HiF1 α (p = 0,006; n = 83)....	73
Abbildung 28: DFS-Überlebenskurve für Marker PD-L1Immun (p=0,095; n=69; nicht signifikant).....	74
Abbildung 29: DFS-Überlebenskurve für PD-1Immun (p=0,080; n=71; nicht signifikant)	75
Abbildung 30: DFS-Überlebenskurve für PD-L1Immun bei p16-negativen HNSCCs (p=0,083; n=50; nicht signifikant).....	76

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primär-Tumor (T) der Mundhöhle (Wittekind 2010)	13
Tabelle 2: Lymphknotenmetastasen (N) außer Tumore des Nasopharynx (Wittekind 2010) 14	14
Tabelle 3: Fernmetastasen (M) mit Primärtumor im Kopf-Hals-Bereich (Wittekind 2010)	14
Tabelle 4: Residualtumor (R) mit Primärtumor im Kopf-Hals-Bereich (Wittekind 2010).....	14
Tabelle 5: Histopathologisches Grading (G) (Wittekind 2010)	15
Tabelle 6: Stadieneinteilung der HNSCCs (Wittekind 2010).....	15
Tabelle 7: Verwendete Antikörper sowie Positivkontrolle	44
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien (Reagenzien und Puffer)	45
Tabelle 9: Verwendete Geräte	46
Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	46
Tabelle 11: Verwendete Softwareprogramme	46
Tabelle 12: Studienrelevante klinische Parameter	48
Tabelle 13: Immunreaktiver Score (Brizel, Dodge et al. 1999) zur Auswertung der membranständigen Markerexpression (modifiziert nach Remmele und Schicketanz, 1993).....	51
Tabelle 14: Charakterisierung des Patientenkollektives zum Zeitpunkt der Kollektiv-Erstellung	57
Tabelle 15: Lokalisation der Markerdetektion.....	58
Tabelle 16: Ergebnisse der Spearman-Korrelationsanalyse für die einzelnen Marker	62
Tabelle 17: Spearman-Korrelation zwischen Alkoholkonsum / Rauchverhalten / p16- Expression und allen untersuchten Markern	63
Tabelle 18: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination G und Hif1 α	65
Tabelle 19: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination Stage und pAkt.....	66
Tabelle 20: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination cM und Hif1 α (nicht signifikant).....	67
Tabelle 21: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination G und ALDH1 bei p16- positiven HNSCC (nicht signifikant)	68
Tabelle 22: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination Stage und pAkt bei p16- positiven HNSCC (nicht signifikant)	69
Tabelle 23: p-Werte des Log-Rank Tests für Kaplan-Meier Analysen der einzelnen Marke für Gesamtüberleben	70
Tabelle 24: p-Werte des Log-Rank Tests für Kaplan-Meier-Analysen der einzelnen Marker für OS.....	72
Tabelle 25: p-Werte des Log-Rank Tests für Kaplan-Meier-Analysen der einzelnen Marker für DFS.....	74

Tabelle 26: p-Werte des Log-Rank Tests für Kaplan-Meier-Analysen der Marker-Kombinationen für DFS	76
Tabelle 27: Cox-Regressionsmodell für Overall Survival	79
Tabelle 28: Cox-Regression für Disease Free Survival	80
Tabelle 29: pAkt und Migrationsverhalten des Tumors unter Strahlentherapie.....	82
Tabelle 30: Survivin und Migrationsverhalten des Tumors unter Strahlentherapie.....	82
Tabelle 31: PD-L1 und Migrationsverhalten des Tumors unter Strahlentherapie.....	82
Tabelle 32: PD-L1 Immun-Expression und Migrationsverhalten des Tumors unter Strahlentherapie (p=0,065; Exakter Test nach Fisher).....	83
Tabelle 33: p16 und Migrationsverhalten des Tumors unter Strahlentherapie.....	83
Tabelle 34: Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test für die Kombination PD-1Immun-Expression und Rezidiv (p = 0,034)	84

9 Literaturverzeichnis

- Abdraboh, M. E., R. L. Gaur, A. D. Hollenbach, D. Sandquist, M. H. Raj and A. Ouhtit (2011). "Survivin is a novel target of CD44-promoted breast tumor invasion." Am J Pathol **179**(2): 555-563.
- Adelstein, D. J., Y. Li, G. L. Adams, H. Wagner, Jr., J. A. Kish, J. F. Ensley, D. E. Schuller and A. A. Forastiere (2003). "An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer." J Clin Oncol **21**(1): 92-98.
- Altieri, D. C. (2003). "Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer." Oncogene **22**(53): 8581-8589.
- Altieri, D. C. (2003). "Validating survivin as a cancer therapeutic target." Nat Rev Cancer **3**(1): 46-54.
- Alvarez-Tejado, M., S. Naranjo-Suarez, C. Jimenez, A. C. Carrera, M. O. Landazuri and L. del Peso (2001). "Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis." J Biol Chem **276**(25): 22368-22374.
- Ambrosini, G., C. Adida and D. C. Altieri (1997). "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." Nat Med **3**(8): 917-921.
- Amornphimoltham, P., V. Sriuranpong, V. Patel, F. Benavides, C. J. Conti, J. Sauk, E. A. Sausville, A. A. Molinolo and J. S. Gutkind (2004). "Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01." Clin Cancer Res **10**(12 Pt 1): 4029-4037.
- Ang, K. K., J. Harris, R. Wheeler, R. Weber, D. I. Rosenthal, P. F. Nguyen-Tan, W. H. Westra, C. H. Chung, R. C. Jordan, C. Lu, H. Kim, R. Axelrod, C. C. Silverman, K. P. Redmond and M. L. Gillison (2010). "Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer." N Engl J Med **363**(1): 24-35.
- Ang, K. K., J. Harris, R. Wheeler, R. Weber, D. I. Rosenthal, P. F. Nguyen-Tân, W. H. Westra, C. H. Chung, R. C. Jordan, C. Lu, H. Kim, R. Axelrod, C. C. Silverman, K. P. Redmond and M. L. Gillison (2010). "Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer." New England Journal of Medicine **363**(1): 24-35.
- Antonia, S. J., A. Villegas, D. Daniel, D. Vicente, S. Murakami, R. Hui, T. Yokoi, A. Chiappori, K. H. Lee, M. de Wit, B. C. Cho, M. Bourhaba, X. Quantin, T. Tokito, T. Mekhail, D. Planchard, Y. C. Kim, C. S. Karapetis, S. Hiret, G. Ostoros, K. Kubota, J. E. Gray, L. Paz-Ares, J. de Castro Carpeno, C. Wadsworth, G. Melillo, H. Jiang, Y. Huang, P. A. Dennis and M. Ozguroglu (2017). "Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer." N Engl J Med **377**(20): 1919-1929.
- Argiris, A., B. E. Brockstein, D. J. Haraf, K. M. Stenson, B. B. Mittal, M. S. Kies, F. R. Rosen, B. Jovanovic and E. E. Vokes (2004). "Competing causes of death and second primary tumors in patients with locoregionally advanced head and neck cancer treated with chemoradiotherapy." Clin Cancer Res **10**(6): 1956-1962.
- Argiris, A., M. V. Karamouzis, D. Raben and R. L. Ferris (2008). "Head and neck cancer." Lancet **371**(9625): 1695-1709.
- Athanasoula, K. C., H. Gogas, K. Polonifi, A. G. Vaiopoulos, A. Polyzos and M. Mantzourani (2014). "Survivin beyond physiology: Orchestration of multistep carcinogenesis and therapeutic potentials." Cancer Letters **347**(2): 175-182.
- Balermipas, P., Y. Michel, J. Wagenblast, O. Seitz, C. Weiss, F. Rödel, C. Rödel and E. Fokas (2014). "Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive

- chemoradiotherapy in head and neck cancer." British Journal of Cancer **110**(2): 501-509.
- Barker, H. E., J. T. Paget, A. A. Khan and K. J. Harrington (2015). "The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence." Nat Rev Cancer **15**(7): 409-425.
- Bernier, J., C. D'Amico, M. Ozsahin, K. Matuszewska, J. L. Lefebvre, R. H. Greiner, J. Giralt, P. Maingon, F. Rolland, M. Bolla, F. Cognetti, J. Bourhis, A. Kirkpatrick, M. van Glabbeke, R. European Organization for and T. Treatment of Cancer (2004). "Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer." N Engl J Med **350**(19): 1945-1952.
- Blancher, C., J. W. Moore, K. L. Talks, S. Houlbrook and A. L. Harris (2000). "Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines." Cancer Res **60**(24): 7106-7113.
- Blot, W. J., J. K. McLaughlin, D. M. Winn, D. F. Austin, R. S. Greenberg, S. Preston-Martin, L. Bernstein, J. B. Schoenberg, A. Stemhagen and J. F. Fraumeni, Jr. (1988). "Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer." Cancer Res **48**(11): 3282-3287.
- Böcker, W. (2008). Pathologie: mit über 200 Tabellen, Elsevier, Urban & Fischer.
- Bonner, J. A., P. M. Harari, J. Giralt, N. Azarnia, D. M. Shin, R. B. Cohen, C. U. Jones, R. Sur, D. Raben, J. Jassem, R. Ove, M. S. Kies, J. Baselga, H. Youssoufian, N. Amellal, E. K. Rowinsky and K. K. Ang (2006). "Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck." New England Journal of Medicine **354**(6): 567-578.
- Bose, P., N. T. Brockton and J. C. Dort (2013). "Head and neck cancer: from anatomy to biology." Int J Cancer **133**(9): 2013-2023.
- Branstetter, B. F. t., T. M. Blodgett, L. A. Zimmer, C. H. Snyderman, J. T. Johnson, S. Raman and C. C. Meltzer (2005). "Head and neck malignancy: is PET/CT more accurate than PET or CT alone?" Radiology **235**(2): 580-586.
- Brizel, D. M., R. K. Dodge, R. W. Clough and M. W. Dewhirst (1999). "Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome." Radiother Oncol **53**(2): 113-117.
- Brown, L. M., T. J. Mason, L. W. Pickle, P. A. Stewart, P. A. Buffler, K. Burau, R. G. Ziegler and J. F. Fraumeni, Jr. (1988). "Occupational risk factors for laryngeal cancer on the Texas Gulf Coast." Cancer Res **48**(7): 1960-1964.
- Bruhn, M. A., R. B. Pearson, R. D. Hannan and K. E. Sheppard (2010). "Second AKT: the rise of SGK in cancer signalling." Growth Factors **28**(6): 394-408.
- Burtness, B. A., J. Manola, R. Axelrod, A. Argiris, A. A. Forastiere and G. Eastern Cooperative Oncology (2008). "A randomized phase II study of ixabepilone (BMS-247550) given daily x 5 days every 3 weeks or weekly in patients with metastatic or recurrent squamous cell cancer of the head and neck: an Eastern Cooperative Oncology Group study." Ann Oncol **19**(5): 977-983.
- Califano, J., P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi, R. Corio, D. Lee, B. Greenberg, W. Koch and D. Sidransky (1996). "Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization." Cancer Res **56**(11): 2488-2492.
- Califano, J., W. H. Westra, G. Meininger, R. Corio, W. M. Koch and D. Sidransky (2000). "Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions." Clin Cancer Res **6**(2): 347-352.
- Chang, L., P. H. Graham, J. Hao, J. Ni, J. Bucci, P. J. Cozzi, J. H. Kearsley and Y. Li (2014). "PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in

- radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways." Cell Death & Disease **5**(10): e1437-e1437.
- Chaturvedi, A. K., E. A. Engels, R. M. Pfeiffer, B. Y. Hernandez, W. Xiao, E. Kim, B. Jiang, M. T. Goodman, M. Sibug-Saber, W. Cozen, L. Liu, C. F. Lynch, N. Wentzensen, R. C. Jordan, S. Altekruse, W. F. Anderson, P. S. Rosenberg and M. L. Gillison (2011). "Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States." J Clin Oncol **29**(32): 4294-4301.
- Chen, C. H., G. R. Budas, E. N. Churchill, M. H. Disatnik, T. D. Hurley and D. Mochly-Rosen (2008). "Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart." Science **321**(5895): 1493-1495.
- Chen, D. and C. Y. Wang (2019). "Targeting cancer stem cells in squamous cell carcinoma." Precis Clin Med **2**(3): 152-165.
- Chen, D. S. and I. Mellman (2013). "Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle." Immunity **39**(1): 1-10.
- Chen, S. W., S. H. Li, D. B. Shi, W. M. Jiang, M. Song, A. K. Yang, Y. D. Li, J. X. Bei, W. K. Chen and Q. Zhang (2019). "Expression of PD-1/PD-L1 in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance." Int J Biol Markers **34**(4): 398-405.
- Chow, L. Q. M., R. Haddad, S. Gupta, A. Mahipal, R. Mehra, M. Tahara, R. Berger, J. P. Eder, B. Burtness, S. H. Lee, B. Keam, H. Kang, K. Muro, J. Weiss, R. Geva, C. C. Lin, H. C. Chung, A. Meister, M. Dolled-Filhart, K. Pathiraja, J. D. Cheng and T. Y. Seiwert (2016). "Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort." J Clin Oncol **34**(32): 3838-3845.
- Clay, M. R., M. Tabor, J. H. Owen, T. E. Carey, C. R. Bradford, G. T. Wolf, M. S. Wicha and M. E. Prince (2010). "Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase." Head Neck **32**(9): 1195-1201.
- Cohen, E. E. W., R. B. Bell, C. B. Bifulco, B. Burtness, M. L. Gillison, K. J. Harrington, Q. T. Le, N. Y. Lee, R. Leidner, R. L. Lewis, L. Licitra, H. Mehanna, L. K. Mell, A. Raben, A. G. Sikora, R. Uppaluri, F. Whitworth, D. P. Zandberg and R. L. Ferris (2019). "The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC)." J Immunother Cancer **7**(1): 184.
- D'Souza, G., A. R. Kreimer, R. Viscidi, M. Pawlita, C. Fakhry, W. M. Koch, W. H. Westra and M. L. Gillison (2007). "Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer." N Engl J Med **356**(19): 1944-1956.
- D'Cruz, A. K., R. Vaish, N. Kapre, M. Dandekar, S. Gupta, R. Hawaldar, J. P. Agarwal, G. Pantvaidya, D. Chaukar, A. Deshmukh, S. Kane, S. Arya, S. Ghosh-Laskar, P. Chaturvedi, P. Pai, S. Nair, D. Nair and R. Badwe (2015). "Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer." New England Journal of Medicine **373**(6): 521-529.
- De Craene, B. and G. Berx (2013). "Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression." Nat Rev Cancer **13**(2): 97-110.
- Deng, L., H. Liang, B. Burnette, M. Beckett, T. Darga, R. R. Weichselbaum and Y. X. Fu (2014). "Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice." J Clin Invest **124**(2): 687-695.
- Deutschinoff, G., C. Friedrich, U. Thiem, R. Voigtmann and L. Pientka (2005). "Lebensqualität in der Onkologie." Der Onkologe **11**(2): 164-172.

- Dohi, T., K. Okada, F. Xia, C. E. Wilford, T. Samuel, K. Welsh, H. Marusawa, H. Zou, R. Armstrong, S. Matsuzawa, G. S. Salvesen, J. C. Reed and D. C. Altieri (2004). "An IAP-IAP complex inhibits apoptosis." J Biol Chem **279**(33): 34087-34090.
- Dong, Y., S. Ochsenreither, C. Cai, A. M. Kaufmann, A. E. Albers and X. Qian (2017). "Aldehyde dehydrogenase 1 isoenzyme expression as a marker of cancer stem cells correlates to histopathological features in head and neck cancer: A meta-analysis." PLoS One **12**(11): e0187615.
- Economopoulou, P., R. de Bree, I. Kotsantis and A. Psyrri (2019). "Diagnostic Tumor Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) in the Clinical Setting." Frontiers in Oncology **9**(827).
- Economopoulou, P., R. de Bree, I. Kotsantis and A. Psyrri (2019). "Diagnostic Tumor Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) in the Clinical Setting." Front Oncol **9**: 827.
- Economopoulou, P., I. Kotsantis and A. Psyrri (2020). "Special Issue about Head and Neck Cancers: HPV Positive Cancers." International journal of molecular sciences **21**(9): 3388.
- Engelman, J. A., J. Luo and L. C. Cantley (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." Nat Rev Genet **7**(8): 606-619.
- Fakhry, C., W. H. Westra, S. Li, A. Cmelak, J. A. Ridge, H. Pinto, A. Forastiere and M. L. Gillison (2008). "Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial." J Natl Cancer Inst **100**(4): 261-269.
- Fakhry, C., W. H. Westra, S. Li, A. Cmelak, J. A. Ridge, H. Pinto, A. Forastiere and M. L. Gillison (2008). "Improved Survival of Patients With Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial." JNCI: Journal of the National Cancer Institute **100**(4): 261-269.
- Fan, Z., M. Li, X. Chen, J. Wang, X. Liang, H. Wang, Z. Wang, B. Cheng and J. Xia (2017). "Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a Meta-analysis." Scientific reports **7**: 43008-43008.
- Farnebo, L., K. Tiefenbock, A. Ansell, L. K. Thunell, S. Garvin and K. Roberg (2013). "Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients." Int J Cancer **133**(8): 1994-2003.
- Fietkau, R., M. Barten, G. Klautke, E. Klar, K. Ludwig, H. Thomas, W. Brinckmann, A. Friedrich, F. Prall, G. Hartung, U. Kuchenmeister and G. Kundt (2006). "Postoperative chemotherapy may not be necessary for patients with ypN0-category after neoadjuvant chemoradiotherapy of rectal cancer." Dis Colon Rectum **49**(9): 1284-1292.
- Forster, M. D. and M. J. Devlin (2018). "Immune Checkpoint Inhibition in Head and Neck Cancer." Front Oncol **8**: 310.
- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood and T. Honjo (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." J Exp Med **192**(7): 1027-1034.
- Freier, K., S. Pungs, C. Sticht, C. Flechtenmacher, P. Lichter, S. Joos and C. Hofele (2007). "High survivin expression is associated with favorable outcome in advanced primary oral squamous cell carcinoma after radiation therapy." Int J Cancer **120**(4): 942-946.

- Fu, H. C., I. C. Chuang, Y. C. Yang, P. C. Chuang, H. Lin, Y. C. Ou, C. C. Chang Chien, H. S. Huang and H. Y. Kang (2018). "Low P16(INK4A) Expression Associated with High Expression of Cancer Stem Cell Markers Predicts Poor Prognosis in Cervical Cancer after Radiotherapy." Int J Mol Sci **19**(9).
- Goerner, M., T. Y. Seiwert and H. Sudhoff (2010). "Molecular targeted therapies in head and neck cancer--an update of recent developments." Head Neck Oncol **2**: 8.
- Gordon, S. R., R. L. Maute, B. W. Dulken, G. Hutter, B. M. George, M. N. McCracken, R. Gupta, J. M. Tsai, R. Sinha, D. Corey, A. M. Ring, A. J. Connolly and I. L. Weissman (2017). "PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity." Nature **545**(7655): 495-499.
- Gottgens, E. L., C. Ostheimer, P. N. Span, J. Bussink and E. M. Hammond (2018). "HPV, hypoxia and radiation response in head and neck cancer." Br J Radiol: 20180047.
- Gotz, C., O. Bissinger, C. Nobis, K. D. Wolff, E. Drecoll and A. Kolk (2018). "ALDH1 as a prognostic marker for lymph node metastasis in OSCC." Biomed Rep **9**(4): 284-290.
- Grandis, J. R. and D. J. Tweardy (1993). "Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer." Cancer Res **53**(15): 3579-3584.
- Gregoire, V., J. L. Lefebvre, L. Licitra, E. Felip and E.-E.-E. G. W. Group (2010). "Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **21 Suppl 5**: v184-186.
- Gu, L., M. Chen, D. Guo, H. Zhu, W. Zhang, J. Pan, X. Zhong, X. Li, H. Qian and X. Wang (2017). "PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis." PLoS One **12**(8): e0182692.
- Guan, J., R. Wang, S. Hasan, L. Tao, M. Wazir, A. G. Jain, X. Zhu, S. Perkins, S. Mohamed, C. C. Chang and S. Mori (2019). "Prognostic Significance of the Dynamic Change of Programmed Death-ligand 1 Expression in Patients with Multiple Myeloma." Cureus **11**(4): e4401.
- Guram, K., P. D. Sanders, S. Miyauchi, S. Kim, A. Venuti, E. Cohen, J. S. Gutkind, L. K. Mell and A. Sharabi (2018). "Analysis of Anti-Tumor Immune Responses with Radiation Combined with Anti-PD-L1 Immunotherapy in an HPV Specific Head & Neck Cancer Model." International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics **102**(3): S153.
- Haisfield-Wolfe, M. E., D. B. McGuire, K. Soeken, J. Geiger-Brown and B. R. De Forge (2009). "Prevalence and correlates of depression among patients with head and neck cancer: a systematic review of implications for research." Oncol Nurs Forum **36**(3): E107-125.
- Hashibe, M., P. Brennan, S. Benhamou, X. Castellsague, C. Chen, M. P. Curado, L. Dal Maso, A. W. Daudt, E. Fabianova, L. Fernandez, V. Wunsch-Filho, S. Franceschi, R. B. Hayes, R. Herrero, S. Koifman, C. La Vecchia, P. Lazarus, F. Levi, D. Mates, E. Matos, A. Menezes, J. Muscat, J. Eluf-Neto, A. F. Olshan, P. Rudnai, S. M. Schwartz, E. Smith, E. M. Sturgis, N. Szeszenia-Dabrowska, R. Talamini, Q. Wei, D. M. Winn, D. Zaridze, W. Zatonski, Z. F. Zhang, J. Berthiller and P. Boffetta (2007). "Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium." J Natl Cancer Inst **99**(10): 777-789.

- Hattori, M., H. Sakamoto, K. Satoh and T. Yamamoto (2001). "DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes." Cancer Lett **169**(2): 155-164.
- Hernández-Vila, C. (2016). "Current prognosis and quality of life following surgical treatment for head and neck squamous cell carcinoma." Plastic and Aesthetic Research **3**: 203-210.
- Herold-Mende, C., S. Seiter, A. I. Born, E. Patzelt, M. Schupp, J. Zoller, F. X. Bosch and M. Zoller (1996). "Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck." J Pathol **179**(1): 66-73.
- Hirsch, F. R., A. McElhinny, D. Stanforth, J. Ranger-Moore, M. Jansson, K. Kulangara, W. Richardson, P. Towne, D. Hanks, B. Vennapusa, A. Mistry, R. Kalamegham, S. Averbuch, J. Novotny, E. Rubin, K. Emancipator, I. McCaffery, J. A. Williams, J. Walker, J. Longshore, M. S. Tsao and K. M. Kerr (2017). "PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project." Journal of Thoracic Oncology **12**(2): 208-222.
- Hoffmann, M. and S. Tribius (2018). "[HPV and oropharyngeal squamous cell cancer in the 8th edition of the TNM classification]." Laryngorhinotologie **97**(9): 641-649.
- Hong, A., M. Zhang, A. S. Veillard, J. Jahanbani, C. S. Lee, D. Jones, G. Harnett, J. Clark, M. Elliott, C. Milross and B. Rose (2013). "The prognostic significance of hypoxia inducing factor 1- α in oropharyngeal cancer in relation to human papillomavirus status." Oral Oncol **49**(4): 354-359.
- Horn, D., C. Freudsperger, D. Holzinger, K. Kunzmann, P. Plinkert, G. Dyckhoff, J. Hoffmann, K. Freier and J. Hess (2017). "Upregulation of pAKT(Ser473) expression in progression of HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma." Head Neck **39**(12): 2397-2405.
- Hosokawa, Y., K. Okumura, S. Terashima and Y. Sakakura (2012). "Radiation protective effect of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) on human oral squamous cell carcinoma cell lines." Radiat Prot Dosimetry **152**(1-3): 159-163.
- Huang, J., J. Zhang, C. Shi, L. Liu and Y. Wei (2016). "Survival, recurrence and toxicity of HNSCC in comparison of a radiotherapy combination with cisplatin versus cetuximab: a meta-analysis." BMC Cancer **16**: 689.
- Huang, L. J., X. F. Deng, F. Chang, X. L. Wu, Y. Wu and Q. Z. Diao (2018). "Prognostic significance of programmed cell death ligand 1 expression in patients with ovarian carcinoma: A systematic review and meta-analysis." Medicine (Baltimore) **97**(43): e12858.
- Huang, L. L. and Y. K. Shi (2019). "[Immunocheckpoint inhibition in head and neck squamous cell carcinoma: the current status and progress]." Zhonghua Zhong Liu Za Zhi **41**(9): 641-647.
- Ishiwata, T. (2016). "Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Novel therapeutic targets for cancer." Pathol Int **66**(11): 601-608.
- Islam, A., H. Kageyama, N. Takada, T. Kawamoto, H. Takayasu, E. Isogai, M. Ohira, K. Hashizume, H. Kobayashi, Y. Kaneko and A. Nakagawara (2000). "High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma." Oncogene **19**(5): 617-623.
- Jacobi, F., M. Höfler, J. Strehle, S. Mack, A. Gerschler, L. Scholl, M. A. Busch, U. Maske, U. Hapke, W. Gaebel, W. Maier, M. Wagner, J. Zielasek and H. U. Wittchen (2016). "Erratum zu: Psychische Störungen in der

- Allgemeinbevölkerung. Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland und ihr Zusatzmodul „Psychische Gesundheit“ (DEGS1-MH)." Der Nervenarzt **87**(1): 88-90.
- Jha, S., S. Vande Pol, N. S. Banerjee, A. B. Dutta, L. T. Chow and A. Dutta (2010). "Destabilization of TIP60 by human papillomavirus E6 results in attenuation of TIP60-dependent transcriptional regulation and apoptotic pathway." Mol Cell **38**(5): 700-711.
- Jordan, A. R., R. R. Racine, M. J. Hennig and V. B. Lokeshwar (2015). "The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment." Front Immunol **6**: 182.
- Karamouzis, M. V., J. R. Grandis and A. Argiris (2007). "Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas." JAMA **298**(1): 70-82.
- Khan, Z., N. Khan, R. P. Tiwari, I. K. Patro, G. B. Prasad and P. S. Bisen (2010). "Down-regulation of survivin by oxaliplatin diminishes radioresistance of head and neck squamous carcinoma cells." Radiother Oncol **96**(2): 267-273.
- Khanna, M., C. H. Chen, A. Kimble-Hill, B. Parajuli, S. Perez-Miller, S. Baskaran, J. Kim, K. Dria, V. Vasiliou, D. Mochly-Rosen and T. D. Hurley (2011). "Discovery of a novel class of covalent inhibitor for aldehyde dehydrogenases." J Biol Chem **286**(50): 43486-43494.
- Kiessling, S. Y., M. A. Broglie, A. Soltermann, G. F. Huber and S. J. Stoeckli (2018). "Comparison of PI3K Pathway in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer With and Without Tobacco Exposure." Laryngoscope Investig Otolaryngol **3**(4): 283-289.
- Kim, J., J. H. Shin, C. H. Chen, L. Cruz, L. Farnebo, J. Yang, P. Borges, G. Kang, D. Mochly-Rosen and J. B. Sunwoo (2017). "Targeting aldehyde dehydrogenase activity in head and neck squamous cell carcinoma with a novel small molecule inhibitor." Oncotarget **8**(32): 52345-52356.
- Kim, S.-W., J. Roh and C.-S. Park (2016). "Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips." Journal of pathology and translational medicine **50**(6): 411-418.
- Kim, T. J., J. W. Lee, S. Y. Song, J. J. Choi, C. H. Choi, B. G. Kim, J. H. Lee and D. S. Bae (2006). "Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer." British Journal of Cancer **94**(11): 1678-1682.
- Knackstedt, R., T. A. Sussman, L. McCahon, J. M. Song, P. Funchain and B. Gastman (2019). "Pre-treated anti-PD-1 refractory Merkel cell carcinoma successfully treated with the combination of PD-1/PD-L1 axis inhibitors and TVEC: a report of two cases." Annals of Oncology **30**(8): 1399-1400.
- Kobayashi, K., K. Hisamatsu, N. Suzui, A. Hara, H. Tomita and T. Miyazaki (2018). "A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer." Journal of clinical medicine **7**(9): 241.
- Kobayashi, K., K. Hisamatsu, N. Suzui, A. Hara, H. Tomita and T. Miyazaki (2018). "A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer." J Clin Med **7**(9).
- Koch-Institut, R. and G. d. e. K. i. D. e.V. (2019). Krebs in Deutschland 2015/2016, Robert Koch-Institut.
- Kramer, B., M. Polit, R. Birk, N. Rotter and C. Aderhold (2018). "HIF-1alpha and mTOR - Possible Novel Strategies of Targeted Therapies in p16-positive and -negative HNSCC." Cancer Genomics Proteomics **15**(3): 175-184.
- Laughner, E., P. Taghavi, K. Chiles, P. C. Mahon and G. L. Semenza (2001). "HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha)

- synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression." Mol Cell Biol **21**(12): 3995-4004.
- Leemans, C. R., B. J. Braakhuis and R. H. Brakenhoff (2011). "The molecular biology of head and neck cancer." Nat Rev Cancer **11**(1): 9-22.
- Li, F. and D. C. Altieri (1999). "The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression." Cancer Res **59**(13): 3143-3151.
- Lindahl, R. (1992). "Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis." Crit Rev Biochem Mol Biol **27**(4-5): 283-335.
- Lindenblatt Rde, C., G. L. Martinez, L. E. Silva, P. S. Faria, D. R. Camisasca and Q. Lourenco Sde (2012). "Oral squamous cell carcinoma grading systems--analysis of the best survival predictor." J Oral Pathol Med **41**(1): 34-39.
- Liu, C., D. Mann, U. K. Sinha and N. C. Kokot (2018). "The molecular mechanisms of increased radiosensitivity of HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC): an extensive review." J Otolaryngol Head Neck Surg **47**(1): 59.
- Lyu, J., H. Song, Z. Tian, Y. Miao, G. Ren and W. Guo (2016). "Predictive value of pAKT/PTEN expression in oral squamous cell carcinoma treated with cetuximab-based chemotherapy." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol **121**(1): 67-72.
- Lyu, X., M. Zhang, G. Li, Y. Jiang and Q. Qiao (2019). "PD-1 and PD-L1 Expression Predicts Radiosensitivity and Clinical Outcomes in Head and Neck Cancer and is Associated with HPV Infection." J Cancer **10**(4): 937-948.
- Ma, I. and A. L. Allan (2011). "The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells." Stem Cell Rev **7**(2): 292-306.
- Mallen-St Clair, J., M. Alani, M. B. Wang and E. S. Srivatsan (2016). "Human papillomavirus in oropharyngeal cancer: The changing face of a disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **1866**(2): 141-150.
- Mandal, R., Y. Senbabaoglu, A. Desrichard, J. J. Havel, M. G. Dalin, N. Riaz, K. W. Lee, I. Ganly, A. A. Hakimi, T. A. Chan and L. G. Morris (2016). "The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications." JCI Insight **1**(17): e89829.
- Marioni, G., A. Bertolin, L. Giacomelli, R. Marchese-Ragona, M. Savastano, N. Calgaro, F. Marino, C. De Filippis and A. Staffieri (2006). "Expression of the apoptosis inhibitor protein Survivin in primary laryngeal carcinoma and cervical lymph node metastasis." Anticancer Res **26**(5B): 3813-3817.
- Marur, S., G. D'Souza, W. H. Westra and A. A. Forastiere (2010). "HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic." Lancet Oncol **11**(8): 781-789.
- Marusawa, H., S. Matsuzawa, K. Welsh, H. Zou, R. Armstrong, I. Tamm and J. C. Reed (2003). "HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression." EMBO J **22**(11): 2729-2740.
- Maserejian, N. N., K. J. Joshipura, B. A. Rosner, E. Giovannucci and A. I. Zavras (2006). "Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(4): 774-781.
- Masoud, G. N. and W. Li (2015). "HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy." Acta Pharm Sin B **5**(5): 378-389.
- Massarelli, E., D. D. Liu, J. J. Lee, A. K. El-Naggar, L. Lo Muzio, S. Staibano, S. De Placido, J. N. Myers and V. A. Papadimitrakopoulou (2005). "Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer." Cancer **104**(11): 2430-2436.

- Mast, T. T. M. G. (2014). Kopf-Hals-Malignome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, W. Zuckschwerdt Verlag.
- Matsumoto, S., S. Batra, K. Saito, H. Yasui, R. Choudhuri, C. Gadiseti, S. Subramanian, N. Devasahayam, J. P. Munasinghe, J. B. Mitchell and M. C. Krishna (2011). "Antiangiogenic agent sunitinib transiently increases tumor oxygenation and suppresses cycling hypoxia." Cancer Res **71**(20): 6350-6359.
- Micaily, I., J. Johnson and A. Argiris (2020). "An update on angiogenesis targeting in head and neck squamous cell carcinoma." Cancers of the Head & Neck **5**(1): 5.
- Michifuri, Y., Y. Hirohashi, T. Torigoe, A. Miyazaki, J. Kobayashi, T. Sasaki, J. Fujino, H. Asanuma, Y. Tamura, K. Nakamori, T. Hasegawa, H. Hiratsuka and N. Sato (2012). "High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis." Pathology International **62**(10): 684-689.
- Michifuri, Y., Y. Hirohashi, T. Torigoe, A. Miyazaki, J. Kobayashi, T. Sasaki, J. Fujino, H. Asanuma, Y. Tamura, K. Nakamori, T. Hasegawa, H. Hiratsuka and N. Sato (2012). "High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis." Pathol Int **62**(10): 684-689.
- Misra, S., P. Heldin, V. C. Hascall, N. K. Karamanos, S. S. Skandalis, R. R. Markwald and S. Ghatak (2011). "Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy." FEBS J **278**(9): 1429-1443.
- Mita, A. C., M. M. Mita, S. T. Nawrocki and F. J. Giles (2008). "Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics." Clin Cancer Res **14**(16): 5000-5005.
- Moral, M. and J. M. Paramio (2008). "Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC." Histol Histopathol **23**(10): 1269-1278.
- Moreb, J. S., D. Mohuczy, B. Ostmark and J. R. Zucali (2007). "RNAi-mediated knockdown of aldehyde dehydrogenase class-1A1 and class-3A1 is specific and reveals that each contributes equally to the resistance against 4-hydroperoxycyclophosphamide." Cancer Chemother Pharmacol **59**(1): 127-136.
- Motz, G. T. and G. Coukos (2013). "Deciphering and reversing tumor immune suppression." Immunity **39**(1): 61-73.
- Mülhardt, C. (2013). Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics, Springer Berlin Heidelberg.
- Munk, K. (2000). Grundstudium Biologie - Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution, Spektrum Akademischer Verlag.
- Munscher, A., S. Prochnow, A. Gulati, G. Sauter, B. Lorincz, M. Blessmann, H. Hanken, A. Bottcher and T. S. Clauditz (2019). "Survivin expression in head and neck squamous cell carcinomas is frequent and correlates with clinical parameters and treatment outcomes." Clin Oral Investig **23**(1): 361-367.
- Murakami, D., S. Tsujitani, T. Osaki, H. Saito, K. Katano, S. Tatebe and M. Ikeguchi (2007). "Expression of phosphorylated Akt (pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy." Gastric Cancer **10**(1): 45-51.
- Nassar, D. and C. Blanpain (2016). "Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications." Annu Rev Pathol **11**: 47-76.
- Nauta, I. H., M. M. Rietbergen, A. A. J. D. van Bokhoven, E. Bloemena, B. I. Lissenberg-Witte, D. A. M. Heideman, R. J. Baatenburg de Jong, R. H. Brakenhoff and C. R. Leemans (2018). "Evaluation of the eighth TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands and the importance of additional HPV DNA testing." Annals of Oncology **29**(5): 1273-1279.

- Nawroz, H., P. van der Riet, R. H. Hruban, W. Koch, J. M. Ruppert and D. Sidransky (1994). "Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Res **54**(5): 1152-1155.
- NCI (2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." Clin Pharmacol Ther **69**(3): 89-95.
- Neid, M. and A. Tannapfel (2009). "Intraepitheliale Plattenepithelneoplasie (WHO 2005)." HNO **57**(2): 181-188.
- Nickson, C. M., P. Moori, R. J. Carter, C. P. Rubbi and J. L. Parsons (2017). "Misregulation of DNA damage repair pathways in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma contributes to cellular radiosensitivity." Oncotarget **8**(18).
- Nowak, F., J. C. Soria and F. Calvo (2012). "Tumour molecular profiling for deciding therapy-the French initiative." Nat Rev Clin Oncol **9**(8): 479-486.
- Onoyama, M., Y. Kitadai, Y. Tanaka, R. Yuge, K. Shinagawa, S. Tanaka, W. Yasui and K. Chayama (2013). "Combining molecular targeted drugs to inhibit both cancer cells and activated stromal cells in gastric cancer." Neoplasia **15**(12): 1391-1399.
- Ortiz, R. C., N. M. Lopes, N. G. Amor, J. B. Ponce, C. K. Schmerling, V. S. Lara, R. A. Moyses and C. O. Rodini (2018). "CD44 and ALDH1 immunoexpression as prognostic indicators of invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma." J Oral Pathol Med **47**(8): 740-747.
- Osaka, E., T. Suzuki, S. Osaka, Y. Yoshida, H. Sugita, S. Asami, K. Tabata, A. Hemmi, M. Sugitani, N. Nemoto and J. Ryu (2006). "Survivin as a prognostic factor for osteosarcoma patients." Acta Histochem Cytochem **39**(3): 95-100.
- Oweida, A., M. Hararah, A. V. Phan, D. C. Binder, S. Bhatia, S. Lennon, S. Bukkapatnam, B. Van Court, N. Uyanga, L. Darragh, H. M. Kim, D. Raben, A.-C. Tan, L. Heasley, E. T. Clambey, R. A. Nemenoff and S. D. Karam (2018). "Resistance to radiotherapy and PD-L1 blockade is mediated by TIM-3 upregulation and regulatory T-cell infiltration." Clinical Cancer Research: clincanres.1038.2018.
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." Nat Rev Cancer **12**(4): 252-264.
- Pawelczyk, K., A. Piotrowska, U. Ciesielska, K. Jablonska, N. Gletzel-Plucinska, J. Grzegorzolka, M. Podhorska-Okolow, P. Dziegiel and K. Nowinska (2019). "Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological Factors and Diagnostic Markers." International journal of molecular sciences **20**(4): 824.
- Peitzsch, C., J. Nathansen, S. I. Schniewind, F. Schwarz and A. Dubrovskaja (2019). "Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Identification, Characterization and Clinical Implications." Cancers (Basel) **11**(5).
- Pelucchi, C., S. Gallus, W. Garavello, C. Bosetti and C. La Vecchia (2008). "Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver." Eur J Cancer Prev **17**(4): 340-344.
- Perez-Ordóñez, B., M. Beauchemin and R. C. Jordan (2006). "Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck." J Clin Pathol **59**(5): 445-453.
- Perri, F., R. Pacelli, G. Della Vittoria Scarpati, L. Cella, M. Giuliano, F. Caponigro and S. Pepe (2015). "Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Biological bases and therapeutic implications." Head Neck **37**(5): 763-770.
- Perrone, F., S. Suardi, E. Pastore, P. Casieri, M. Orsenigo, S. Caramuta, G. Dagrada, M. Losa, L. Licitra, P. Bossi, S. Staurenngo, M. Oggionni, L. Locati, G. Cantu, M. Squadrelli, A. Carbone, M. A. Pierotti and S. Pilotti (2006). "Molecular and

- cytogenetic subgroups of oropharyngeal squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **12**(22): 6643-6651.
- Phillips, R. J., J. Mestas, M. Gharaee-Kermani, M. D. Burdick, A. Sica, J. A. Belperio, M. P. Keane and R. M. Strieter (2005). "Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha." J Biol Chem **280**(23): 22473-22481.
- Pickhard, A., S. Grober, A. K. Haug, G. Piontek, M. Wirth, U. Strassen, M. Rudelius and R. Reiter (2014). "Survivin and pAkt as potential prognostic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol **117**(6): 733-742.
- Pickhard, A. C., J. Margraf, A. Knopf, T. Stark, G. Piontek, C. Beck, A. L. Boulesteix, E. Q. Scherer, S. Pigorsch, J. Schlegel, W. Arnold and R. Reiter (2011). "Inhibition of radiation induced migration of human head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways." Bmc Cancer **11**.
- Pickhard, A. C., J. Margraf, A. Knopf, T. Stark, G. Piontek, C. Beck, A. L. Boulesteix, E. Q. Scherer, S. Pigorsch, J. Schlegel, W. Arnold and R. Reiter (2011). "Inhibition of radiation induced migration of human head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways." BMC Cancer **11**: 388.
- Pignon, J. P., J. Bourhis, C. Domenge and L. Designe (2000). "Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer." Lancet **355**(9208): 949-955.
- Pignon, J. P., A. le Maître, E. Maillard and J. Bourhis (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.
- Prasad, V. and V. Kaestner (2017). "Nivolumab and pembrolizumab: Monoclonal antibodies against programmed cell death-1 (PD-1) that are interchangeable." Semin Oncol **44**(2): 132-135.
- Proia, N. K., G. M. Paszkiewicz, M. A. Nasca, G. E. Franke and J. L. Pauly (2006). "Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(6): 1061-1077.
- Qian, X., C. Ma, X. Nie, J. Lu, M. Lenarz, A. M. Kaufmann and A. E. Albers (2015). "Biology and immunology of cancer stem(-like) cells in head and neck cancer." Crit Rev Oncol Hematol **95**(3): 337-345.
- Qian, X., S. Wagner, C. Ma, A. Coordes, J. Gekeler, J. P. Klussmann, M. Hummel, A. M. Kaufmann and A. E. Albers (2014). "Prognostic significance of ALDH1A1-positive cancer stem cells in patients with locally advanced, metastasized head and neck squamous cell carcinoma." Journal of Cancer Research and Clinical Oncology **140**(7): 1151-1158.
- Raha, D., T. R. Wilson, J. Peng, D. Peterson, P. Yue, M. Evangelista, C. Wilson, M. Merchant and J. Settleman (2014). "The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation." Cancer Res **74**(13): 3579-3590.
- Remmele, W. and K. H. Schicketanz (1993). "Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS)." Pathol Res Pract **189**(8): 862-866.

- Riley, J. L. (2009). "PD-1 signaling in primary T cells." *Immunol Rev* **229**(1): 114-125.
- Ritprajak, P. and M. Azuma (2015). "Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma." *Oral Oncol* **51**(3): 221-228.
- Rodriguez, R., M. Garcia-Gonzalez, M. G. Guerrero and C. Lara (1994). "Ammonium-sensitive protein kinase activity in plasma membranes of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*." *FEBS Lett* **350**(1): 19-23.
- Sah, N. K., Z. Khan, G. J. Khan and P. S. Bisen (2006). "Structural, functional and therapeutic biology of survivin." *Cancer Lett* **244**(2): 164-171.
- Sanhueza, C., S. Wehinger, J. Castillo Bennett, M. Valenzuela, G. I. Owen and A. F. G. Quest (2015). "The twisted survivin connection to angiogenesis." *Molecular Cancer* **14**(1): 198.
- Sato, F., T. Ono, A. Kawahara, T. Kawaguchi, H. Tanaka, K. Shimamatsu, T. Kakuma, J. Akiba, H. Umeno and H. Yano (2019). "Prognostic impact of p16 and PD-L1 expression in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma receiving a definitive treatment." *J Clin Pathol* **72**(8): 542-549.
- Schlecht, N. F., E. L. Franco, J. Pintos and L. P. Kowalski (1999). "Effect of smoking cessation and tobacco type on the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil." *Epidemiology* **10**(4): 412-418.
- Schneider, S., L. Kadletz, R. Wiebringhaus, L. Kenner, E. Selzer, T. Füreder, O. Rajky, A. S. Berghoff, M. Preusser and G. Heiduschka (2018). "PD-1 and PD-L1 expression in HNSCC primary cancer and related lymph node metastasis - impact on clinical outcome." *Histopathology* **73**(4): 573-584.
- Schuettler, D., G. Piontek, M. Wirth, B. Haller, R. Reiter, G. Brockhoff and A. Pickhard (2015). "Selective inhibition of EGFR downstream signaling reverses the irradiation-enhanced migration of HNSCC cells." *Am J Cancer Res* **5**(9): 2660-2672.
- Schulz, D., I. Stancev, A. Sorrentino, A. N. Menevse, P. Beckhove, G. Brockhoff, M. G. Hautmann, T. E. Reichert, R. J. Bauer and T. Ettl (2019). "Increased PD-L1 expression in radioresistant HNSCC cell lines after irradiation affects cell proliferation due to inactivation of GSK-3beta." *Oncotarget* **10**(5): 573-583.
- Segrelles, C., M. Moral, M. F. Lara, S. Ruiz, M. Santos, H. Leis, R. Garcia-Escudero, A. B. Martinez-Cruz, J. Martinez-Palacio, P. Hernandez, C. Ballestin and J. M. Paramio (2006). "Molecular determinants of Akt-induced keratinocyte transformation." *Oncogene* **25**(8): 1174-1185.
- Seiwert, T., B. Burtness, J. Weiss, I. Gluck, J. Eder, S. Pai, M. Dolled-Filhart, K. Emancipator, K. Pathiraja, C. Gause, R. Iannone, H. Brown, J. Houp, J. Cheng and L. Chow (2014). "A phase Ib study of MK-3475 in patients with human papillomavirus (HPV)-associated and non-HPV-associated head and neck (H/N) cancer." *Journal of Clinical Oncology* **32**: 6011-6011.
- Semenza, G. L. (2000). "HIF-1 and human disease: one highly involved factor." *Genes Dev* **14**(16): 1983-1991.
- Semrau, R., R. P. Mueller, H. Stuetzer, S. Staar, U. Schroeder, O. Guntinas-Lichius, M. Kocher, H. T. Eich, A. Dietz, M. Flentje, V. Rudat, P. Volling, M. Schroeder and H. E. Eckel (2006). "Efficacy of intensified hyperfractionated and accelerated radiotherapy and concurrent chemotherapy with carboplatin and 5-fluorouracil: updated results of a randomized multicentric trial in advanced head-and-neck cancer." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **64**(5): 1308-1316.
- Shahnavaz, S. A., J. A. Regezi, G. Bradley, I. D. Dube and R. C. Jordan (2000). "p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas." *J Pathol* **190**(4): 417-422.

- Singh, S., C. Brocker, V. Koppaka, Y. Chen, B. C. Jackson, A. Matsumoto, D. C. Thompson and V. Vasiliou (2013). "Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress." Free Radic Biol Med **56**: 89-101.
- Smeets, S. J., M. van der Plas, T. B. Schaaij-Visser, E. A. van Veen, J. van Meerloo, B. J. Braakhuis, R. D. Steenbergen and R. H. Brakenhoff (2011). "Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways." Int J Cancer **128**(7): 1596-1605.
- Song, Z., X. Yao and M. Wu (2003). "Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis." J Biol Chem **278**(25): 23130-23140.
- Sorensen, B. S., M. Busk, M. R. Horsman, J. Alsner, J. Overgaard, A. H. Kyle and A. I. Minchinton (2014). "Effect of radiation on cell proliferation and tumor hypoxia in HPV-positive head and neck cancer in vivo models." Anticancer Res **34**(11): 6297-6304.
- Spector, M. E., K. K. Gallagher, E. Bellile, S. B. Chinn, M. Ibrahim, S. Byrd, E. J. Chanowski, H. M. Walline, J. S. Moyer, M. E. Prince, G. T. Wolf, C. R. Bradford, J. B. McHugh, K. Cordell, T. Carey, F. P. Worden, A. Eisbruch and D. B. Chepeha (2014). "Patterns of nodal metastasis and prognosis in human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma." Head Neck **36**(9): 1233-1240.
- Sridharan, V., D. N. Margalit, S. A. Lynch, M. Severgnini, J. Zhou, N. G. Chau, G. Rabinowits, J. H. Lorch, P. S. Hammerman, F. S. Hodi, R. I. Haddad, R. B. Tishler and J. D. Schoenfeld (2016). "Definitive chemoradiation alters the immunologic landscape and immune checkpoints in head and neck cancer." British Journal of Cancer **115**(2): 252-260.
- Sriuranpong, V., J. I. Park, P. Amornphimoltham, V. Patel, B. D. Nelkin and J. S. Gutkind (2003). "Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system." Cancer Res **63**(11): 2948-2956.
- Srivastava, R. M., S. C. Lee, P. A. Andrade Filho, C. A. Lord, H.-B. Jie, H. C. Davidson, A. López-Albaitero, S. P. Gibson, W. E. Gooding, S. Ferrone and R. L. Ferris (2013). "Cetuximab-Activated Natural Killer and Dendritic Cells Collaborate to Trigger Tumor Antigen-Specific T-cell Immunity in Head and Neck Cancer Patients." Clinical Cancer Research **19**(7): 1858-1872.
- Stegeman, H., J. H. Kaanders, D. L. Wheeler, A. J. van der Kogel, M. M. Verheijen, S. J. Waaijer, M. Iida, R. Grenman, P. N. Span and J. Bussink (2012). "Activation of AKT by hypoxia: a potential target for hypoxic tumors of the head and neck." BMC Cancer **12**: 463.
- Stegeman, H., P. N. Span, W. J. Peeters, M. M. Verheijen, R. Grenman, T. W. Meijer, J. H. Kaanders and J. Bussink (2016). "Interaction between hypoxia, AKT and HIF-1 signaling in HNSCC and NSCLC: implications for future treatment strategies." Future Sci OA **2**(1): Fso84.
- Sturgis, E. M. and P. M. Cinciripini (2007). "Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers?" Cancer **110**(7): 1429-1435.
- Sun, D. Y., H. Yu, X. B. Qiu, G. Li and N. Zhang (2016). "Relationships between CD44, hyaluronic acid expression and lymphatic metastasis and radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma." **27**: 286-291.
- Sun, M., J. E. Paciga, R. I. Feldman, Z. Yuan, D. Coppola, Y. Y. Lu, S. A. Shelley, S. V. Nicosia and J. Q. Cheng (2001). "Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen

- receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K." Cancer Res **61**(16): 5985-5991.
- Swain, N., S. Routray and R. Hosalkar (2017). CD(Cluster of Differentiation) 44.
- Swartz, J. E., A. J. Pothan, I. Stegeman, S. M. Willems and W. Grolman (2015). "Clinical implications of hypoxia biomarker expression in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review." Cancer medicine **4**(7): 1101-1116.
- Szymonowicz, K., S. Oeck, N. M. Malewicz and V. Jendrossek (2018). "New Insights into Protein Kinase B/Akt Signaling: Role of Localized Akt Activation and Compartment-Specific Target Proteins for the Cellular Radiation Response." Cancers (Basel) **10**(3).
- Thomas, G. R., H. Nadiminti and J. Regalado (2005). "Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma." Int J Exp Pathol **86**(6): 347-363.
- Toker, A. and M. Yoeli-Lerner (2006). "Akt signaling and cancer: surviving but not moving on." Cancer Res **66**(8): 3963-3966.
- Topalian, S. L., M. Sznol, D. F. McDermott, H. M. Kluger, R. D. Carvajal, W. H. Sharfman, J. R. Brahmer, D. P. Lawrence, M. B. Atkins, J. D. Powderly, P. D. Leming, E. J. Lipson, I. Puzanov, D. C. Smith, J. M. Taube, J. M. Wigginton, G. D. Kollia, A. Gupta, D. M. Pardoll, J. A. Sosman and F. S. Hodi (2014). "Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab." J Clin Oncol **32**(10): 1020-1030.
- Tran, J., J. Rak, C. Sheehan, S. D. Saibil, E. LaCasse, R. G. Korneluk and R. S. Kerbel (1999). "Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **264**(3): 781-788.
- Tumorzentrum-München (2014). Kopf-Hals-Malignome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, W. Zuckschwerdt Verlag.
- Vaira, V., C. W. Lee, H. L. Goel, S. Bosari, L. R. Languino and D. C. Altieri (2007). "Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling." Oncogene **26**(19): 2678-2684.
- van Hal, N. L., G. A. van Dongen, M. Stigter-van Walsum, G. B. Snow and R. H. Brakenhoff (1999). "Characterization of CD44v6 isoforms in head-and-neck squamous-cell carcinoma." Int J Cancer **82**(6): 837-845.
- van Houten, V. M., M. P. Tabor, M. W. van den Brekel, J. A. Kummer, F. Denkers, J. Dijkstra, R. Leemans, I. van der Waal, G. B. Snow and R. H. Brakenhoff (2002). "Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer." J Pathol **198**(4): 476-486.
- Vartanian, J. G., S. N. Rogers and L. P. Kowalski (2017). "How to evaluate and assess quality of life issues in head and neck cancer patients." Curr Opin Oncol.
- Vaupel, P. and A. Mayer (2007). "Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome." Cancer Metastasis Rev **26**(2): 225-239.
- Venuti, A. and F. Paolini (2012). "HPV detection methods in head and neck cancer." Head Neck Pathol **6 Suppl 1**(Suppl 1): S63-74.
- Vermorcken, J. B., R. Mesia, F. Rivera, E. Remenar, A. Kawecki, S. Rottey, J. Erfan, D. Zabolotnyy, H. R. Kienzer, D. Cupissol, F. Peyrade, M. Benasso, I. Vynnychenko, D. De Raucourt, C. Bokemeyer, A. Schueler, N. Amellal and R. Hitt (2008). "Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer." N Engl J Med **359**(11): 1116-1127.

- Vigneswaran, N. and M. D. Williams (2014). "Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis." Oral and maxillofacial surgery clinics of North America **26**(2): 123-141.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." Nat Rev Cancer **2**(7): 489-501.
- Vivek, R., S. Kannan, S. Achiraman, R. Thirumurugan, D. S. Ganesh and M. Krishnan (2011). "Survivin deficiency leads to imparalization of cytokinesis in cancer cells." Asian Pac J Cancer Prev **12**(7): 1675-1679.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer and N. Munoz (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol **189**(1): 12-19.
- Waligorska-Stachura, J., A. Jankowska, R. Wasko, W. Liebert, M. Biczysko, A. Czarnywojtek, D. Baszko-Blaszyk, V. Shimek and M. Ruchala (2012). "Survivin--prognostic tumor biomarker in human neoplasms--review." Ginekol Pol **83**(7): 537-540.
- Wang, S. J. and L. Y. Bourguignon (2011). "Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance." Am J Pathol **178**(3): 956-963.
- Wang, S. J., V. B. Wreesmann and L. Y. Bourguignon (2007). "Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer." Head Neck **29**(6): 550-558.
- Webber, C., M. Gospodarowicz, L. H. Sobin, C. Wittekind, F. L. Greene, M. D. Mason, C. Compton, J. Brierley and P. A. Groome (2014). "Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review." Int J Cancer **135**(2): 371-378.
- West, K. A., S. S. Castillo and P. A. Dennis (2002). "Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance." Drug Resist Updat **5**(6): 234-248.
- Wicha, M. S., S. Liu and G. Dontu (2006). "Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift." Cancer Research **66**(4): 1883-1890.
- Wild-Bode, C., M. Weller and W. Wick (2001). "Molecular determinants of glioma cell migration and invasion." J Neurosurg **94**(6): 978-984.
- Wittekind, C. (2010). "[2010 TNM system: on the 7th edition of TNM classification of malignant tumors]." Pathologe **31**(5): 331-332.
- Wittekind, C. (2017). TNM: Klassifikation maligner Tumoren, Wiley VCH Verlag GmbH.
- Würtemberger, G. and R. L. H. Murphy Test - Die richtigen Antworten zu den 14 Test-Fragen. Auskultationskurs Lunge. G. Würtemberger and R. L. H. Murphy, Thieme.
- Xia, Y., L. Jiang and T. Zhong (2018). "The role of HIF-1 α in chemo-/radioresistant tumors." OncoTargets and therapy **11**: 3003-3011.
- Xu, X., S. Chai, P. Wang, C. Zhang, Y. Yang, Y. Yang and K. Wang (2015). "Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells." Cancer Lett **369**(1): 50-57.
- Xue, G. and B. A. Hemmings (2013). "PKB/Akt-dependent regulation of cell motility." J Natl Cancer Inst **105**(6): 393-404.
- Yan, Y., X. Zuo and D. Wei (2015). "Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target." Stem Cells Transl Med **4**(9): 1033-1043.
- Yang, W. F., M. C. M. Wong, P. J. Thomson, K. Y. Li and Y. X. Su (2018). "The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis." Oral Oncol **86**: 81-90.

- Yoshida, A. (1992). "Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase." Pharmacogenetics **2**(4): 139-147.
- Yu, Z., P. M. Weinberger, C. Sasaki, B. L. Egleston, W. F. t. Speier, B. Haffty, D. Kowalski, R. Camp, D. Rimm, E. Vairaktaris, B. Burtneess and A. Psyrrri (2007). "Phosphorylation of Akt (Ser473) predicts poor clinical outcome in oropharyngeal squamous cell cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(3): 553-558.
- Yun, Y.-J., S.-H. Li, Y.-S. Cho, J.-W. Park and Y.-S. Chun (2010). "Survivin mediates prostate cell protection by HIF-1 α against zinc toxicity." The Prostate **70**: 1179-1188.
- Zaffaroni, N. and M. G. Daidone (2002). "Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions." Drug Resist Updat **5**(2): 65-72.
- Zandberg, D. P. and S. E. Strome (2014). "The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck." Oral Oncol **50**(7): 627-632.
- Zhang, J., A. Lu, L. Li, J. Yue and Y. Lu (2010). "p16 Modulates VEGF Expression via Its Interaction With HIF-1 α in Breast Cancer Cells." Cancer Investigation **28**(6): 588-597.
- Zhang, P., N. Mirani, A. Baisre and H. Fernandes (2014). "Molecular heterogeneity of head and neck squamous cell carcinoma defined by next-generation sequencing." Am J Pathol **184**(5): 1323-1330.
- Zheng, H., L. L. Li, D. S. Hu, X. Y. Deng and Y. Cao (2007). "Role of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma." Cell Mol Immunol **4**(3): 185-196.
- Zhong, H., K. Chiles, D. Feldser, E. Laughner, C. Hanrahan, M. M. Georgescu, J. W. Simons and G. L. Semenza (2000). "Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics." Cancer Res **60**(6): 1541-1545.
- Zhou, L., M. Wang, C. Guo, Y. Zhu, H. Yu, L. Zhang and P. Yu (2018). "Expression of pAkt is associated with a poor prognosis in Chinese women with invasive ductal breast cancer." Oncol Lett **15**(4): 4859-4866.
- Ziemann, F., A. Arenz, S. Preising, C. Wittekindt, J. P. Klussmann, R. Engenhart-Cabillic and A. Wittig (2015). "Increased sensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines to x-irradiation +/- Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis." Am J Cancer Res **5**(3): 1017-1031.

10 Anhang

Tabellen A-J: Immunhistochemische Auswertung der einzelnen Biomarker

		AKTCutOff			
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	65	53,7	75,6	75,6
	1	21	17,4	24,4	100,0
	Gesamt	86	71,1	100,0	
Fehlend	System	35	28,9		
Gesamt		121	100,0		

		AKT-Score			
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	51	42,1	59,3	59,3
	2	14	11,6	16,3	75,6
	3	4	3,3	4,7	80,2
	4	4	3,3	4,7	84,9
	5	4	3,3	4,7	89,5
	6	3	2,5	3,5	93,0
	7	6	5,0	7,0	100,0
	Gesamt	86	71,1	100,0	
Fehlend	System	35	28,9		
Gesamt		121	100,0		

Tabelle A: Immunhistochemische Auswertung für pAkt

		SurvivinCutoff			
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	71	58,7	74,7	74,7
	1	24	19,8	25,3	100,0
	Gesamt	95	78,5	100,0	
Fehlend	System	26	21,5		
Gesamt		121	100,0		

		Survivin-Score			
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	43	35,5	45,7	45,7
	2	27	22,3	28,7	74,5
	3	11	9,1	11,7	86,2

	4	10	8,3	10,6	96,8
	5	2	1,7	2,1	98,9
	6	1	,8	1,1	100,0
	Gesamt	94	77,7	100,0	
Fehlend	System	27	22,3		
Gesamt		121	100,0		

Tabelle B: Immunhistochemische Auswertung für Survivin

		HifCutoff			
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	34	28,1	37,8	37,8
	1	56	46,3	62,2	100,0
	Gesamt	90	74,4	100,0	
Fehlend	System	31	25,6		
Gesamt		121	100,0		

		Hif1Alpha-Score			
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	12	9,9	13,0	13,0
	1	1	,8	1,1	14,1
	2	23	19,0	25,0	39,1
	3	11	9,1	12,0	51,1
	4	14	11,6	15,2	66,3
	5	14	11,6	15,2	81,5
	6	8	6,6	8,7	90,2
	7	9	7,4	9,8	100,0
	Gesamt	92	76,0	100,0	
Fehlend	System	29	24,0		
Gesamt		121	100,0		

Tabelle C: Immunhistochemische Auswertung für Hif1 α

		CD44Cutoff			
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	5	4,1	5,3	5,3
	1	90	74,4	94,7	100,0
	Gesamt	95	78,5	100,0	
Fehlend	System	26	21,5		

Gesamt		121	100,0		
--------	--	-----	-------	--	--

CD44-Score

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	3	2,5	3,2	3,2
	3	1	,8	1,1	4,3
	4	1	,8	1,1	5,4
	5	2	1,7	2,2	7,5
	6	2	1,7	2,2	9,7
	7	84	69,4	90,3	100,0
	Gesamt	93	76,9	100,0	
Fehlend	System	28	23,1		
Gesamt		121	100,0		

Tabelle D: Immunhistochemische Auswertung für CD44

ALDHCutoff

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	46	38,0	51,7	51,7
	1	43	35,5	48,3	100,0
	Gesamt	89	73,6	100,0	
Fehlend	System	32	26,4		
Gesamt		121	100,0		

ALDH1-Score

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	41	33,9	46,6	46,6
	2	4	3,3	4,5	51,1
	3	4	3,3	4,5	55,7
	4	3	2,5	3,4	59,1
	5	6	5,0	6,8	65,9
	6	8	6,6	9,1	75,0
	7	22	18,2	25,0	100,0
	Gesamt	88	72,7	100,0	
Fehlend	System	33	27,3		
Gesamt		121	100,0		

Tabelle E: Immunhistochemische Auswertung für ALDH1

PDL1 CutOff

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	24	19,8	27,9	27,9
	1	62	51,2	72,1	100,0
	Gesamt	86	71,1	100,0	
Fehlend	System	35	28,9		
Gesamt		121	100,0		

PDL1Score

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	24	19,8	28,6	28,6
	1	30	24,8	35,7	64,3
	2	12	9,9	14,3	78,6
	3	8	6,6	9,5	88,1
	4	6	5,0	7,1	95,2
	5	4	3,3	4,8	100,0
	Gesamt	84	69,4	100,0	
Fehlend	System	37	30,6		
Gesamt		121	100,0		

Tabelle F: Immunhistochemische Auswertung für PD-L1

PDL1ImmunCutOff

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	21	17,4	24,4	24,4
	1	65	53,7	75,6	100,0
	Gesamt	86	71,1	100,0	
Fehlend	System	35	28,9		
Gesamt		121	100,0		

PDL1ImmunProzent

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	20	16,5	23,5	23,5
	1	33	27,3	38,8	62,4
	2	9	7,4	10,6	72,9
	3	1	,8	1,2	74,1
	4	2	1,7	2,4	76,5
	5	11	9,1	12,9	89,4

	6	2	1,7	2,4	91,8
	8	1	,8	1,2	92,9
	10	3	2,5	3,5	96,5
	15	1	,8	1,2	97,6
	20	1	,8	1,2	98,8
	>30	1	,8	1,2	100,0
	Gesamt	85	70,2	100,0	
Fehlend	System	36	29,8		
Gesamt		121	100,0		

Tabelle G: Immunhistochemische Auswertung für PD-L1_Immun

PD1-CutOff					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	82	67,8	96,5	96,5
	1	3	2,5	3,5	100,0
	Gesamt	85	70,2	100,0	
Fehlend	System	36	29,8		
Gesamt		121	100,0		

PD1Score					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	82	67,8	96,5	96,5
	1	2	1,7	2,4	98,8
	>5	1	,8	1,2	100,0
	Gesamt	85	70,2	100,0	
Fehlend	System	36	29,8		
Gesamt		121	100,0		

Tabelle H: Immunhistochemische Auswertung für PD-1

PD1ImmunCutoff					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	56	46,3	65,1	65,1
	1	30	24,8	34,9	100,0
	Gesamt	86	71,1	100,0	
Fehlend	System	35	28,9		
Gesamt		121	100,0		

PD1ImmunProzent

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	55	45,5	64,7	64,7
	1	18	14,9	21,2	85,9
	5	7	5,8	8,2	94,1
	10	4	3,3	4,7	98,8
	>20	1	,8	1,2	100,0
	Gesamt	85	70,2	100,0	
Fehlend	System	36	29,8		
Gesamt		121	100,0		

Tabelle I: Immunhistochemische Auswertung für PD-1_Immun

P16

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	69	57,0	75,0	75,0
	1	23	19,0	25,0	100,0
	Gesamt	92	76,0	100,0	
Fehlend	System	29	24,0		
Gesamt		121	100,0		

Tabelle J: Immunhistochemische Auswertung für p16

11 Veröfentlichungen

Schaffelhofer A., Pickhard A., Pigorsch S., Buchberger AMS, 2019. „pAkt-, Survivin-, and PD-L1-association with tumor-recurrence at the radiation-field margin“

Im Rahmen des 63. österreichischen HNO-Kongress 2019 (ID 654454) von 11. – 15. September 2019 in Salzburg wurde die vorliegende Arbeit unter obenstehendem Titel eingereicht und präsentiert. Hierfür wurde der Heinz Kurz Preis der österreichischen Gesellschaft für Hals, Nasen und Ohrenheilkunde verliehen.

12 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei meiner ursprünglichen Doktorarbeitsbetreuerin Frau apl. Prof. Dr. med. Anja C. Pickhard und meiner Co-Betreuerin Frau Dr. med. Maria Buchberger bedanken, die mir die Möglichkeit zur medizinischen Promotion im Klinikum rechts der Isar an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der TU München gegeben haben. Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Priv.-Doz. Dr. Markus Wirth, welcher bereitwillig die Betreuung meiner Doktorarbeit in der Endphase übernommen hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. med. Maria Buchberger für ihre großartige Hilfsbereitschaft und Hilfestellungen beginnend bei der Planung der Arbeit bis hin zur Korrektur. Sie hatte stets ein offenes Ohr für fachliche Diskussionen aber auch persönliche Anliegen – eine Tatsache, die neben ihrer Tätigkeit in der Patientenversorgung keine Selbstverständlichkeit darstellt.

Auch möchte ich mich recht herzlich bei Frau PD Dr. med. Steffi Pigorsch für die Zurverfügungstellung der Daten aus der Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie, sowie ihre kompetenten Hilfestellungen bei fachlichen Fragen.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Herrn Guido Piontek für die Hilfestellung bei der Erstellung der immunhistochemischen Gewebeschnitte und deren Auswertung sowie zahlreichen fachlichen Diskussionen.

Allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe bin ich zu großem Dank verpflichtet für die vielen inspirierenden Diskussionen im Labor, Büro oder im Journal Club. Insbesondere sei hier Herr Dr. med. Alexander Baumann zu erwähnen, der mich auf die Idee dieser Arbeit brachte und stets als Ratgeber zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern, meiner Schwester und im Speziellen meinen erst kürzlich verstorbenen Großeltern Josef und Ingeborg Schaffelhofer danken, die stets hinter mir und diesem Projekt standen und so die Höhen und vor allem vielen Tiefen dieses Projektes gemeinsam mit mir geduldig durchgestanden haben. Ich kann ihnen nicht genug für ihr Verständnis und ihre Ratschläge danken, sie waren stets Inspiration und Motivation für mich. Zuletzt danke ich all meinen Freunden und Studienkollegen, die mich während des langen Entstehungsprozesses dieser Arbeit immer wieder ermutigt haben. Eure Engelsgeduld und sachliche Kritik werde ich nie vergessen.