

Aus dem Institut für Pathologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. S. Perner

**Über den Aufbau einer Kopf-Hals-Karzinomgewebekohorte
und ihren Nutzen am Beispiel der Beschreibung der
Tumorimmuninfiltration und der Rolle der EVI1 Expression**

Inauguraldissertation

Zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Patrick Kuppler

aus Dormagen

Lübeck 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sven Perner

2. Berichterstatter*in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Begriffserklärung.....	1
1.2 Epidemiologie	1
1.3 Ätiologie und Risikofaktoren.....	1
1.4 Histologie des HNSCC.....	2
1.4.1 Pathologie	2
1.4.2 Molekularpathologie	3
1.5 UICC Klassifikation.....	4
1.6 Weitere Tumorklassifizierungen	6
1.7 Therapieoptionen	7
1.8 Prognose	9
1.8.1 Prognosefaktoren	10
1.9 EVI1	10
1.10 TIME	11
1.11 Ziel der Dissertationsarbeit.....	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Kohorte	13
2.1.1 Kohortenaufbau	13
2.1.2 Deskriptive Kohortendaten	14
2.1.3 Verlauf	15
2.1.4 Risikofaktoren	16
2.2 Tumorgewebe	17
2.2.1 Herstellung von Tissue Micro Arrays	17

2.2.2	Immunhistochemische Färbung	18
2.2.3	Histologische Auswertung	19
2.3	Statistische Auswertung.....	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Kohorte	25
3.1.1	5-Jahres Überlebens Analysen der Lübecker HNSCC Kohorte	25
3.1.2	Lokalisationen im Vergleich	25
3.1.3	UICC Stadien der 7. und 8. Generation im Vergleich	25
3.1.4	Lokalrezidiv (RD)	26
3.1.5	Lymphknotenmetastasen (LM)	26
3.1.6	Fernmetastasen (DM)	26
3.1.7	p16 Status	27
3.1.8	Grading, Alter, Geschlecht	28
3.1.9	Exogene Risikofaktoren im Vergleich	28
3.2	Die Rolle der EVI1 Expression für HNSCC	29
3.2.1	Unterschiedliche EVI1 Expression in verschiedenen Lokalisationen	29
3.2.2	Höhere EVI1 Expression in bereits bei ED metastasierten Primarien	30
3.2.3	Höhere EVI1 Expression in PT gegenüber korrespondierender LM	30
3.2.4	Höhere EVI1 Expression in p16 positiven HNSCC Primarien	31
3.2.5	Trend für EVI1 Expressionsabfall entlang des Metastasierungsweges	32
3.2.6	EVI1 in HNSCC korreliert nicht mit dem Patientenalter, UICC Stadium, dem mittleren Gesamtüberleben, dem mittleren krankheitsfreien Überleben und hat keinen Einfluss auf die Prognostik unterschiedlicher Therapieregime	33
3.3	Die Beschreibung des TIME anhand von HE Färbungen	34
3.3.1	Immunzellverteilung in PT	36
3.3.2	Vergleich der Immunzellverteilung der p16 positiven und p16 negativen HNSCC	37
3.3.3	Einfluss der Immunzellverteilung im PT auf das mittlere 5-Jahres-Gesamtüberleben und das mittlere krankheitsfreie 5-Jahres-Überleben	37
3.3.4	Immunzellverteilung in RD	39

3.3.5 Einfluss der Immunzellverteilung in Abhängigkeit unterschiedlicher Therapieregime auf das mittlere 5-Jahres Gesamtüberleben	39
4 Diskussion	41
4.1 Beurteilung der Methodik.....	41
4.1.1 Kohortenaufbau	41
4.1.2 Material	42
4.1.3 Färbungen	43
4.1.4 Quantitative Auswertung	43
4.2 Beurteilung der Ergebnisse	46
4.2.1 Kohorte	46
4.2.2 EVI1	49
4.2.3 Immunzellverteilung	52
4.3 Aussicht.....	54
5 Zusammenfassung der Arbeit und der Ergebnisse	56
5.1 Kohortendaten.....	56
5.2 Die Rolle der EVI1 Expression	56
5.3 Immunzellverteilung	57
Literaturverzeichnis	59
Appendix	66
Danksagung	70
Lebenslauf	71
Selbstständigkeitserklärung	73

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	LNR	Lymph node ratio
AML	Akute myeloische Leukämie	LM	Lymph metastasis
App.	Appendix	MDS	Myelodysblastisches Syndrom
c	clinical	MR	Mundraum
CC1	Tris-Borat-EDTA Puffer	OP	Oropharynx
CD3	Cluster of differentiation 3	OPSCC	Oropharynxkarzinom
CML	Chronische myeloische Leukämie	OS	Overall survival
		p	pathological
CPS	Combined positive score	p53	Protein 53
CUP	Cancer of unknown primary	PD-1	Programmed cell death protein
DFS	Disease free survival		1
DM	distant metastasis	PD-L1	Programmed cell death 1 ligand
ECS	extracapsular spread		1
ED	Erstdiagnose	PM	positive margins
EGFR	Epithelial growth factor receptor	pRB	Retinoblastom-Protein
		PT	Primary tumor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent-assay	PY	Pack years
		R	Residualtumor
EVI1	Ecotropic viral intergration site 1	RD	Recurrent disease
		ROI	Region of interest
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded	siRNA	Small interfering ribonucleic acid
FHIT	Fragile Histidine Triad Gene	TIL	Tumour infiltrating lymphocytes
G	Grading	TIME	Tumour immune
Gy	Grey		microenvironment
HE	Hämatoxylin und Eosin	TMA	Tissue micro Arrey
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma	TME	Tumour microenvironment
		TNM	Tumor Nodus Metastase
HP	Hypopharynx	UICC	Union for international cancer control
HPV	Humanes Papillomvirus		
HR	Hazard Ratio		
ICD-10	International code of disease 10		
ICI	Immun check point inhibitor		
IHC	Immunhistochemie		
L	Larynx		

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften von HPV positiven und HPV negativen HNSCC	4
Tabelle 2a): 8. Auflage der TNM Klassifikation für HNSCC des Mundraums.....	4
Tabelle 2b): 8. UICC Klassifikation für HNSCC des Mundraumes	6
Tabelle 3a): Histopathologische Grading (G)-Kategorien	7
Tabelle 3b): Residualtumor (R)-Klassifikation	7
Tabelle 4: Reklassifikation nach neuer 8. UICC Edition	14
Tabelle 5: Verteilung der anatomischen Lokalisationen	15
Tabelle 6: Auflistung der erhobenen klinisch-pathologischen Kohorten Daten	16
Tabelle 7: Kriterien des Immunzell-Verteilungsstatus	22
Appendix 1: Univariate Cox Regression möglicher prognosebestimmender Variablen	66
Appendix 2: Multivariate Cox Regression der signifikant prognostischen Variablen	66
Appendix 4: Veröffentlichungen auf Grundlage der Lübecker HNSCC Gewebe-Kohorte	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bsp. eines Lübecker Tissue Micro Arrays (L-TMA 27)	18
Abbildung 2: Tumorcores nach Zirkelannotation und Analyse durch Definiens mit Beispielausschnitten für homogene a), heterogene b) und keine Expression c)	21
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Immunzellverteilung im Vergleich zu den zugehörigen HE gefärbten Tumorausschnitten.....	23
Abbildung 4: Mittleres Gesamtüberleben nach 5 Jahren im Vergleich zwischen Lokalisationen a), UICC Stadien der 7. und 8. Edition b) RD-, LM-, DM Status c), und p16 Status für HNSCC, OPSCC und nicht-OPSCC d)	28
Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurven für mittleres 5-Jahres Gesamtüberleben hinsichtlich der Raucheranamnese a) und des Alkoholabusus b)	29
Abbildung 6: EVI1 Verteilung über die verschiedenen HNSCC Lokalisationen	30
Abbildung 7: Vergleich der EVI1-Expression zwischen PT/N0 und PT/N+ (Pfad a) und zwischen PT und korrespondierender LM (Pfad b)	31
Abbildung 8: Beispielausschnitte für unterschiedliche EVI1-Expression im PT a) zu korrespondierender LM b)	31
Abbildung 9: Vergleich der EVI1 Expression in p16 negativen und p16 positiven HNSCC a) und OPSCC b)	32
Abbildung 10: Vergleich der EVI1 Expression in verschiedenen Tumorgeweben	33
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurven für mittleres 5-Jahres Gesamtüberleben a) und mittleres 5-Jahres-krankheitsfreies Überleben b).....	34
Abbildung 12: Beispiele der TIME Kategorien cold, hot und excluded mit Ergänzung der lymphozytären Verteilung (CD3)	35

Abbildung 13: Immunzellverteilung im PT für Hypopharynx (HP), Larynx (L), Mundraum (MR) und Oropharynx (OP) jeweils für p16 positiv und negativ	36
Abbildung 14: Tortendiagramme zur Immunzellverteilung in p16 negativen a) und p16 positiven b) HNSCC	37
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurven für mittleres 5-Jahres Gesamtüberleben für Immunzellverteilung cold, hot, excluded a) und cold versus non-cold b)	38
Abbildung 16: Signifikant niedrigeres 5-Jahres Überleben für cold Immunzellverteilung gegenüber hot (Pfad a) und excluded (Pfad b)	39
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven für mittleres 5-Jahres Gesamtüberleben für die Immunzellverteilung in Abhängigkeit vom Therapieregim: OP a), OP/Radiochemotherapie b), OP/Bestrahlung c)	40
Appendix 3: Kaplan-Meier-Kurven für mittleres 5-Jahres-krankheitsfreies Überleben für Immunzellverteilung cold, hot, excluded a) und cold versus non-cold b)	67

1 Einleitung

1.1 Begriffserklärung

In der vorliegenden Arbeit geht es um den Aufbau und den Nutzen einer Gewebekohorte mit Plattenepithelkarzinomen unterschiedlicher Lokalisation im Kopf-Hals-Bereich und die Notwendigkeit der weiteren molekularen und immunologischen Charakterisierung dieser Tumorentität. Unter dem Begriff Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (engl. head and neck squamous cell cancer, HNSCC) im eigentlichen Sinne werden primäre Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, des Larynx, des Oro- und des Hypopharynx zusammengefasst. Auch die Plattenepithelkarzinome in zervikalen Lymphknoten, denen sich kein Primärtumor zuordnen lässt (engl. cancer of unknown primary, CUP), werden als HNSCC geführt [1].

1.2 Epidemiologie

Das HNSCC ist weltweit der sechsthäufigste maligne Tumor und steht an achter Stelle im Hinblick auf tumorabhängige Todesursachen [2,3]. Das typische mittlere Erkrankungsalter liegt geschlechterspezifisch bei 62 Lebensjahren für Männer und 63 für Frauen [4]. Männer erkranken dabei in etwa 3-mal häufiger an HNSCC als Frauen [5]. Eine in den letzten Jahren zunehmende Inzidenz stellt dabei ein großes Gesundheitsproblem dar. Im Schnitt erkranken in Deutschland jährlich 3680 Frauen und 9450 Männer, was Erkrankungsraten von 5,9/100.000 und 17,9/100.000 entspricht. Davon sterben jährlich 1389 Frauen und 4084 Männer (Sterberaten: 2/100.000, 7,5/100.000) [6]. Die Ursachen für einen tödlichen Ausgang der Erkrankung sind in der Diagnosestellung im meist fortgeschrittenen Stadium, dem dadurch bedingten späten Therapiebeginn und der Rezidivierung nach erfolgter Therapie zu finden [7]. Am häufigsten tritt das HNSCC im Bereich der Mundhöhle auf, gefolgt vom Pharynx und weniger häufig im Larynx [4,5].

1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Für das HNSCC wurden bereits vor längerer Zeit bekannte Risikofaktoren definiert, zu denen vordringlich Alkoholkonsum und das Rauchen von Zigaretten zählen. Das Risiko an einem HNSCC zu erkranken ist bei Rauchern im Vergleich zur Gesamtbevölkerung um den Faktor 20

erhöht. Für Menschen mit regelmäßiger Alkoholkonsum steigt das Risiko um den Faktor 5. In Kombination der beiden exogenen Risikofaktoren wurde eine Risikosteigerung um das 50-fache beschrieben [2]. Ferner führen Infektionen mit viralen Onkogenen, wie dem Humanen Papillomvirus (HPV), zu einer Entwicklung von HNSCC. Die molekularen Mechanismen unterscheiden sich dabei deutlich von denen der nicht-HPV-assoziierten HNSCC, was dazu geführt hat, dass Plattenepithelkarzinome des Oropharynx abhängig vom HPV Status mittlerweile als eigenständige Tumor-Subgruppe geführt werden [1]. Die spezifischen Unterschiede dieser beiden Formen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Weitere Risikofaktoren sind außerdem genetische Disposition, Strahlenexposition, Immunsuppression und schlechte Mundhygiene [8].

1.4 Histologie des HNSCC

1.4.1 Pathologie

Das Plattenepithelkarzinom ist ein maligner epithelialer Tumor, der eine plattenepitheliale Differenzierung aufweist und mit oder ohne Verhornung auftreten kann. Bekannt ist dabei, dass die Tumorgenese als mehrstufiger Prozess abläuft und sich über histologisch definierte Vorstufen, wie intraepitheliale Neoplasien (IEN) oder squamös intraepitheliale Läsionen (SIL), ausbildet, die ihrerseits mit genetischen Veränderungen assoziiert sind [9].

Makroskopisch imponiert es über eine zumeist endophytische Wachstumsform, die in fortgeschrittenen Stadien ulzerieren kann. Selten tritt ein Plattenepithelkarzinom auch durch exophytisch-papilläres Wachstum in Erscheinung. Sie infiltrieren aggressiv und metastasieren lymphogen in die regionären Lymphknoten und seltener hämatogen, dann aber vornehmlich in die Lunge (70%), gefolgt von Leber und Knochen [10].

Mikroskopisch kann man ein invasives Wachstum mit Durchbrechung der Basalmembran, welches die Eskalation der Vorstufen zum Karzinom markiert, und Bildung von Tumorinseln im Gewebe beobachten. Verhorrendes Epithel, das nicht abgeschilfert werden kann, formt dabei häufig so genannte Hornperlen, die als zwiebelartige Nester im Gewebe in Erscheinung treten. Zellmorphologische Veränderungen sind umso ausgeprägter, je weniger differenziert der Tumor ist. Dabei lassen sich Zellkernpleomorphien und verstärkte mitotische Aktivität beobachten [9].

1.4.2 Molekularpathologie

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs können zunächst grob in HPV-positiv und HPV-negativ eingeteilt werden, da sich diese beiden Formen hinsichtlich ihrer molekularen Genese stark voneinander unterscheiden [11].

Bei der klassischen Form, dem HPV-negativen HNSCC, wird angenommen, dass es durch exogene Noxen, wie Tabakrauch und Alkoholkonsum, und genetische Prädisposition zu zellulären Veränderungen der DNA, wie Deletion, Punktmutation und Promotermethylierung, kommt. Diese wiederum führen dazu, dass die Genamplifikation von Tumorsuppressorgenen inaktiviert und von Protoonkogenen aktiviert werden und somit der Zellzyklus gestört wird. Am häufigsten hiervon betroffen sind das Tumorsuppressor-Protein p53, das Retinoblastom-Protein (pRB), das Tumorsuppressorgen Cyclin D1, das Fragile Histidine Triad Gene (FHIT) und der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) [11]. Letztgenannter ist mit einer Häufigkeit von 90% in HNSCC überexprimiert [12] und ist dabei Ziel spezifischer Antikörpertherapien (siehe 1.7 Therapieoptionen).

23,5% der HNSCC und bis zu 50% der Oropharynxkarzinome (engl. oropharyngeal squamous cell carcinoma, OPSCC) in Deutschland weisen einen positiven HPV Status auf und die Inzidenz dieser Form steigt stetig an [11,13]. Es gibt ca. 100 verschiedene HPV-Typen, die sowohl Haut als auch Schleimhäute infizieren können. Dabei werden diese in Hochrisiko und Niedrigrisiko-Typen unterteilt. Hochrisiko-HPV, wie HPV 16 und 18, tragen dabei durch virale Onkoproteine (E6 und E7) zur Tumorentstehung vor allem im Oropharynx bei [14]. Hier führen E6 und E7 gegenüber HPV-negativen HNSCC zu nachweislich unterschiedlichen genetischen Veränderungen, die zu einer Aktivierung des Zellzyklus, der Unterbindung von Apoptose und einer verringerten Immunantwort des Wirts führen können [15]. Zum Beispiel konnte beobachtet werden, dass p53 bei HPV-Positivität meist als Wildtyp vorliegt. Jedoch wird auch hier die Aktivität von p53 vermindert, da das virale Protein E6 p53 inaktiviert [11].

Das Tumorsuppressoren p16 wird bei HNSCC, die durch HPV-Infektion bedingt sind, hochreguliert und kann dadurch als Surrogatmarker einer HPV-assoziierten Tumorgenese verwendet werden. Obwohl diese Koexpression nicht immer übereinstimmt, wird nach der aktuellen UICC Klassifikation (siehe 1.5) der p16 Status dazu genutzt, die HPV-Assoziation eines OPSCC zu erfassen [1,16].

Tabelle 1: Eigenschaften von HPV positiven und HPV negativen HNSCC

Faktor	HPV negative HNSCC	HPV positive HNSCC
Inzidenz	absteigend	ansteigend
Ätiologie	Rauchen, Alkoholabusus	Oralverkehr
Alter	>60 Jahre	<60 Jahre
p53 Mutation	häufig	selten
E6/E7 Onkoproteine	nein	ja
p16-Status	negativ	positiv
Prädilektionsstelle	Keine	Oropharynx
Prognose	ungünstig	günstig

1.5 UICC Klassifikation

Die Stadieneinteilung von HNSCC erfolgt nach der jeweils gültigen *Union internationale contre le cancer* (UICC) Klassifikation anhand der klinischen und pathologischen TNM-Evaluation und wird für die jeweilige anatomische Lokalisation spezifisch klassifiziert (T: Tumor, Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors (engl. primary tumor, PT); N: Nodus, Fehlen bzw. Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (engl. lymph node metastasis, LM); M: Metastasen, Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen (engl. distant metastasis, DM). Das Suffix „c“ (clinical) steht für die klinische, das Suffix „p“ (pathological) für die histologisch gesicherte Beurteilung. Diese Klassifikation unterliegt dabei einer stetigen Anpassung und wurde zuletzt im Januar 2017 auf die aktuelle 8. Edition geändert. Exemplarisch ist hier die Einteilung der Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle in Tabelle 2a) und 2b) aufgeführt [1]:

Tabelle 2a): 8. Auflage der TNM Klassifikation für HNSCC des Mundraumes

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung und 5mm oder weniger maximale Invasionstiefe

T2	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung und mehr als 5mm aber nicht mehr als 10mm maximale Invasionstiefe Tumor mehr als 2 cm aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung und nicht mehr als 10mm maximale Invasionstiefe
T3	Tumor mehr als 4cm in größter Ausdehnung oder maximale Invasionstiefe von mehr als 10mm
T4a	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen der Maxilla oder Mandibula, in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, 3cm oder weniger in größter Ausdehnung ohne extranodale Ausbreitung
N2	Metastase(n) wie nachfolgend beschrieben: <ul style="list-style-type: none"> • N2a Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, mehr als 3cm, aber nicht mehr als 6cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung • N2b Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung • N2c Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
N3a	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
N3b	Metastase(n) in einem einzelnen oder multiplen Lymphknoten, klinisch mit extranodaler Ausbreitung
M	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2b): 8. UICC Klassifikation für HNSCC des Mundraumes

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	No	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IVA	T4a	N0, N1	M0
	T1, T2, T3, T4a	N2	M0
Stadium IVB	Jedes T	N3	M0
	T4b	Jedes N	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

Für die spezifische Unterteilung der übrigen anatomischen Lokalisationen siehe dazu Wittekind et al., 2015 [1]. Die UICC Klassifikation gilt dabei als der stärkste prognostische Faktor in der Diagnostik des HNSCC [17], hilft in der Behandlungsplanung, trägt dazu bei Behandlungsergebnisse auszuwerten und ermöglicht den Informationsaustausch zwischen Behandlungszentren.

1.6 Weitere Tumorklassifizierungen

Weitere Faktoren, die bei der Charakterisierung eines Tumors von Interesse sind und in der klinischen Praxis Anwendung finden, sind der histopathologische Differenzierungsgrad (engl. Grading) sowie das Fehlen oder Vorhandensein von Resttumorgewebe nach Resektion (engl. positive margins, PM). Auch die Invasion von Tumorzellen in Blutgefäße (V), Perineuralscheiden (Pn) oder in Lymphgefäße (L) kann erhoben werden und diese werden hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft diskutiert [18,19].

Im Rahmen des histologischen Gradings werden Merkmale wie die Mitoserate, Zellpleomorphie oder das Vorliegen von Nekrosearealen bestimmt und das Tumorgewebe somit hinsichtlich des Differenzierungsgrades unterteilt. Das Grading soll dabei ein Maß für die Malignität eines Tumors widerspiegeln, welches mit abnehmender Differenzierung des Plattenepithels ansteigt (Vgl. Tabelle 3a) [1]). Diese Graduierung hat jedoch bislang für das HNSCC nur geringen prognostischen und therapeutischen Nutzen bewiesen, da es sich nur

schlecht reproduzieren lässt [20]. Der Bewertung des R-Status nach Resektion demgegenüber kommt wiederum eine prognostische Relevanz hinsichtlich des mittleren Gesamtüberlebens und des mittleren krankheitsfreien Überlebens zu und hat Einfluss auf das anschließende adjuvante Therapiekonzept [21]. Die Einteilung ist dafür Tabelle 3b) zu entnehmen [1].

Tabelle 3a): Histopathologische Grading (G)-Kategorien

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

Tabelle 3b): Residualtumor (R)-Klassifikation

R	Residualtumor
RX	Das Vorhandensein eines Residualtumors kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

1.7 Therapieoptionen

Wichtig in der Behandlung des HNSCC ist die prognostisch günstige Früherkennung des Tumorbefundes, da sich je nach Ausmaß der Erkrankung bei Erstdiagnose (ED) entweder ein kuratives oder palliatives Therapiekonzept anschließt. Dafür werden die bereits aufgeführten Klassifikationssysteme und prognostischen Faktoren in Verbindung mit der Bewertung des Allgemeinzustandes, des Alters und des individuellen Wunsches des Patienten in die spezifische Entscheidungsfindung mit einbezogen. Eine kurative Therapie verfolgt dabei einen heilenden Ansatz, wohingegen die palliative Therapie den Fokus eher auf die Linderung der krankheitsbezogenen Begleiterscheinungen legt und zum Beispiel die Reduktion von Schmerzen beabsichtigt oder organische Funktionseinschränkungen erträglicher gestalten

soll. Eine palliative Versorgung bietet sich demnach bei inoperablen Tumoren mit ungünstiger bis infauster Prognose an.

Die kurativen Therapieoptionen des primären HNSCC umfassen die operative Entfernung in Kombination mit oder ohne adjuvanter Bestrahlung oder ergänzender Radiochemotherapie. Die chirurgische Versorgung kann dabei erhebliche Entstellungen der physiologischen Anatomie nach sich ziehen, die durch Narbenbildung und Funktionseinschränkungen, wie permanenten Schluck- und Sprachstörungen, großen Einfluss auf die posttherapeutische Lebensqualität des Patienten haben können. Der Goldstandard der chirurgischen Versorgung beinhaltet dabei die therapeutische oder prophylaktische lokoregionäre Entfernung von Lymphknoten (engl. neck dissection), deren Nutzen in Abwägung gegen Komplikationen wie Wundheilungsstörungen, Weichteilinfektionen, Vernarbungen, Wundschmerzen und kosmetischen Defiziten jedoch kritisch diskutiert wird [22]. Aus diesem Grund wäre es notwendig, spezifische Marker zu identifizieren, die okkulte LM (cN0) anzeigen und dadurch eine schärfere operative Indikationsstellung möglich machen könnten.

Radiochemotherapie und Chemotherapie können als adjuvante, neoadjuvante oder in palliativer Versorgung auch als primäre Versorgung durchgeführt werden. Jedoch können auch diese ebenso zu wesentlichen Funktionseinschränkungen führen. Dabei neigen Patienten vornehmlich dazu, Schluck- und Sprachstörungen durch Mundtrockenheit (Xerostomie) und Schleimhautnekrosen oder Knochen- und Weichteilatrophie zu erleiden [23]. Je nach Lokalisation und Ausbreitung kann die Strahlentherapie dabei auch als Brachytherapie erfolgen, wodurch das Nebenwirkungsprofil durch geringere Beeinträchtigung des tumorumgebenden Gewebes herabgesenkt wird [24].

Um das Jahr 2010 ist der monoklonale Antikörper Cetuximab als zusätzliches Therapeutikum für die Behandlung des fortgeschrittenen und rezidivierenden HNSCC zugelassen worden und hat in der Phase-III EXTREME Studie in Kombination mit platinhaltigen Chemotherapeutika einen positiven Einfluss auf das mittlere Gesamtüberleben (engl. overall survival, OS) bewiesen [25]. Cetuximab richtet sich gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR, blockiert diese und führt konsekutiv zu einer Herunterregulierung des Wachstumsreizes [26]. Leider haben Folgestudien diesen positiven Einfluss nicht reproduzieren können, weshalb Cetuximab

mittlerweile nur noch bei Patienten erwogen wird, die auf Grund eines schlechten Allgemeinzustands die Standardtherapie nicht vertragen [27].

Seit 2016 werden programmed cell death ligand 1 (PD-1) Immun-Checkpoint Inhibitoren (ICI, Pembrolizumab und Nivolumab) für die Behandlung des rezidivierenden oder metastasierenden HNSCC verwendet [28]. In der Phase-III Keynote-040 Studie konnte bei Patienten, deren Tumoren PD-L1 mit einem kombinierten positiven Score (combined positive score, CPS) >1% exprimierten, bei Monotherapie mit Pembrolizumab ein verlängertes Gesamtüberleben gegenüber der Standardtherapie ermittelt werden. Außerdem konnte der gleiche Effekt, unabhängig von der PD-L1 Expression, durch eine Kombination zwischen ICI und Chemotherapie auch am Gesamtkollektiv beobachtet werden [29]. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten, wie dem Malignen Melanom, hat sich jedoch auch hier gezeigt, dass sich die Prognose nicht vergleichbar verbessert [30,31] und die Suche nach Markern, die das Ansprechen auf ICI anzeigen, dadurch in den Fokus der Forschung stellt [32].

1.8 Prognose

Trotz der Bemühungen neue Therapieoptionen zu etablieren ist die Prognose des HNSCC weiterhin ungünstig. Abhängig von Geschlecht und Lokalisation überleben gerade einmal die Hälfte der HNSCC Patienten die ersten 5 Jahre [5]. Mit steigendem Tumor-Stadium, sinkt dabei das mittlere Überleben. Für UICC III und IV liegt das mittlere 2-Jahres Überleben nach ED gerade mal bei 30% und 30-50% entwickeln ein Lokalrezidiv (engl. recurrent disease, RD), was sich in einem ungünstigen mittleren krankheitsfreien Überleben widerspiegelt [33–36]. Schon seit vielen Jahren zeichnet sich dabei keine signifikante Verbesserung der Prognose ab und herkömmliche Therapieregime wie die neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie zur adjuvanten Bestrahlung in bestimmten klinischen Situationen, wie der Kapselruptur bei LM+ (vgl. 1.8.1 Prognosefaktoren), konnten die Prognose bei erhöhter Toxizität auch nur geringgradig verbessern [33,35,37].

1.8.1 Prognosefaktoren

Die Stadieneinteilung nach UICC wird generell als Goldstandard für die Beurteilung der Prognose von Patienten mit HNSCC gewertet. Dabei wird vor allem dem T-Stadium eine wichtige Komponente zugesprochen, da die lokoregionäre Tumorausbreitung, isoliert betrachtet, allgemein eine schlechtere Prognose anzeigt [17]. Auch die DM ist ein wichtiger prognosebestimmender Faktor [10]. Ein negativer Einfluss auf das Überleben durch das alleinige Auftreten von LM (LM+) hat sich für das HNSCC nicht valide bestätigen lassen und wird in der Literatur unterschiedlich bewertet [38]. Entscheidend für die Prognose sind dabei eher die Anzahl, die Größe und das Verteilungsmuster der LM, was durch zusätzliche Faktoren wie die Kapselruptur mit konsekutiver extrakapsulärer Tumorausbreitung (engl. extracapsular spread, ECS) ergänzt wird, da diese zu einem erhöhten Auftreten von RD und DM führen [39]. Des Weiteren liefern patientenbezogene Faktoren wie das Alter, das Geschlecht, der Allgemeinzustand (zum Beispiel mit Hilfe des Karnofsky Index klassifiziert), und der Immunstatus wichtige Einflusskriterien für den Verlauf und die Prognose der Erkrankung und sind daher wichtige Parameter in der Entscheidung für oder gegen eine Therapieoption [40]. Der Karnofsky Index wichtet dabei symptombezogene Einschränkungen anhand einer prozentualen Gliederung [41]. Weiterhin ist das frühe RD ein prognosebestimmender Faktor, der mit einem frühen Ableben assoziiert ist [42]. Trotz weitreichender Suche konnte bislang jedoch für keinen molekularbiologischen Parameter eine valide prognostische Bedeutung nachgewiesen werden [17] und die Palette an prognosebestimmenden Markern oder solchen, die ein spezifisches Therapieansprechen anzeigen, bleibt für das HNSCC weiterhin limitiert.

Für das OPSCC konnte gezeigt werden, dass ein positiver HPV-Status und die damit einhergehende virale Tumorgenese gegenüber der klassischen Tumorgenese eine günstigere Prognose birgt. In den anderen Tumorlokalisationen hat sich dieser Effekt nicht bestätigt [43].

1.9 EVI1

Ecotropic virus integration site-1 (EVI1) wurde im Jahre 1988 erstmals als retrovirale Integrationsstelle in myeloiden Tumoren in einem Mausmodell identifiziert [44]. In einem Vergleich zwischen den murinen und humanen Gensequenzen ließ sich im Anschluss eine große Überschneidung feststellen, in der sich 95% der Aminosäuren und 91% der Nukleotide

als identisch erwiesen und das EVI1 Gen auf dem Chromosomen-Band 3q26 identifiziert werden konnte [45]. Das resultierende Protein entfaltet in Form eines Zinkfingerproteins dabei die Möglichkeit als Transkriptionsfaktor an spezifische DNA-Sequenzen zu binden und diese dadurch entweder zu aktivieren oder zu unterdrücken [46]. Dadurch wird eine Reihe molekularer Mechanismen ausgelöst, die Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose haben. EVI1 ist in etwa 10% der akut myeloischen Leukämie (AML) hochreguliert und fungiert dort als Marker einer aggressiven Genese mit ungünstiger Prognose [47–51]. Nebst myeloiden Neoplasien hat sich dies auch in soliden Tumoren gezeigt, wo eine hohe Expression mit einer schlechten Prognose einhergeht. Dies ist bislang im kolorektalen Karzinom, im Prostatakarzinom, aber auch bei Ovarial-, Brust- und Lungenkrebs vorbeschrieben worden [52–56]. Weiterhin ist bekannt, dass EVI1 im Kolonkarzinom und im Brustkrebs essentiell für die Entwicklung von Tumormetastasen ist, da Tumorzellen, in denen experimentell die EVI1-Expression herunterreguliert wurde, *in vivo* nicht mehr metastasieren konnten [57]. Über die Rolle von EVI1 in HNSCC ist bislang nichts bekannt.

1.10 TIME

Das Vermögen der Immunzellinfiltration in Tumorgewebe etabliert sich zunehmend als neue „Hallmark of cancer“, da diese einen großen Einfluss auf die Entstehung und Genese maligner Erkrankungen beweist und durch neue Angriffsmöglichkeiten nicht zuletzt zu einer Revolution der Behandlungsstrategien geführt hat [58,59]. Die Tumormikroumgebung (engl. tumor microenvironment, TME) steht dabei im Zentrum der Forschung und wird hinsichtlich der dort befindlichen Zellen und ihres Einflusses auf die Tumorgenese untersucht. Tumorassoziierte Immunzellen können dabei sowohl Funktionen übernehmen, die eine Tumorprogression begünstigen, aber auch zu einem Untergang und Abtöten maligner Zellen führen [59]. Viele Tumore weisen dabei eine Infiltration durch eine heterogene Population von Immunzellen, wie Makrophagen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen auf. Sowohl den CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen als auch den CD4-positiven Helfer-Zellen kommt dabei in vielen soliden Tumoren ein positiver prognostischer Einfluss zugute [60–64]. Dies konnte auch für das HNSCC gezeigt werden [65], was die Immunzellverteilung im TME (tumor immune microenvironment, TIME) hier als einen vielversprechenden Ansatz für die Suche nach prognostischen Einflussgrößen kennzeichnet.

1.11 Ziel der Dissertationsarbeit

Die Zielsetzung dieser Dissertationsarbeit bestand darin, eine repräsentative Gewebekohorte mit Tumorgewebe von HNSCC-Patienten aufzubauen, mit retrospektiv erhobenen klinischen Daten zu verknüpfen und den Nutzen einer solchen Kohorte beispielhaft darzulegen. Dabei sollte der Fokus auf das Screening immunhistochemischer und immunologischer Marker gelegt werden, um die Grundlage für neue prognostische Angriffspunkte zu schaffen und das molekulare Verständnis des HNSCC zu erweitern. Dafür wurde zum einen die Rolle des nukleären Markers EVI1 und sein Einfluss auf die Tumorgenese des HNSCC und die Immunzellverteilung im TME nach einem hierfür neu vorgestellten Schema für das HNSCC als Einflussgrößen definiert, die im Weiteren untersucht und unter Betrachtung aktueller Forschungsdaten analysiert werden sollten. Hinsichtlich der Methodik sollten außerdem verschiedene Herangehensweisen in der Erhebung und Quantifizierung der Daten ersichtlich werden, die das Potential einer solchen Gewebekohorte demonstrieren und den Nutzen für zukünftige Projekte veranschaulichen würden.

Genauer ließen sich dabei folgende Hypothesen formulieren, die im Rahmen dieser Studie beantwortet werden sollten:

1. Lassen sich epidemiologische Daten nationaler und internationaler Datenbanken am Lübecker Kollektiv reproduzieren?
 2. Wie lässt sich die Expression des nukleären Biomarkers EVI1 am sinnvollsten quantifizieren?
 3. Welchen Einfluss hat die Expression von EVI1 in Überlebensanalysen und zeigt der Marker wie in anderen soliden Tumoren ebenso eine ungünstige Prognose an?
 4. Lassen sich andere prognostische Korrelationen erheben und welchen klinischen Stellenwert könnten diese haben?
 5. Wie lässt sich die Beschreibung des TIME für prognostische Analysen am sinnvollsten quantifizieren und klassifizieren?
 6. Könnte die Immunzellverteilung einen Einfluss auf das mittlere Gesamtüberleben oder mittlere krankheitsfreie Überleben haben?
-

2 Material und Methoden

2.1 Kohorte

2.1.1 Kohortenaufbau

Diese retrospektive Studie folgt den Anforderungen der Deklaration von Helsinki aus dem Jahre 1964 [66]. Das dazugehörige Protokoll wurde durch die Ethik-Komission der Universität zu Lübeck (Projekt Code: AZ16-277, siehe App. 5) bewilligt.

Als Grundlage dieser Studie wurde eine neue Gewebekohorte mit Patienten des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck aufgebaut. Hierzu wurde zunächst das klinische Abrechnungssystem des Universitätsklinikums auf international code of disease (ICD) Kodierungen hinsichtlich Plattenepithelkarzinomen (ICD-O-3) und Kopf-Hals Region (ICD-10, C Section) durchsucht und dabei aus den Jahren 2006-2015 insgesamt 1266 Fälle isoliert. Diese wurden wiederum mit der klinischen Datenbank (Agfa Orbis®) und der pathologischen Datenbank (Nexus®) verglichen und nochmals von jeweils einem erfahrenen Hals-Nasen-Ohren-Arzt und einem erfahrenen Pathologen hinsichtlich der anatomischen Lokalisation, der Tumorart und der Menge an archiviertem Tumormaterial analysiert. Einschlusskriterien waren dabei die definitive histopathologische Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereichs und eine ausreichende Menge an archiviertem Tumorgewebe.

Die zugehörigen mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Tumorschnitte auf Objektträgern und das in Paraffin-Blöcken (formalin-fixed paraffin-embeded, FFPE) konservierte Tumormaterial wurde anschließend aus den pathologischen Archiven der Universität zu Lübeck geborgen und auf Verwertbarkeit und Menge geprüft. Nach Zusammenschau des gesichteten Materials wurde die Kohorte mit n=419 Patienten finalisiert. Zusätzlich zum Primärtumorgewebe konnten den einzelnen Patienten spezifisch und abhängig vom jeweiligen Krankheitsverlauf auch RD-Tumorgewebe, LM-Tumorgewebe und DM-Tumorewebe zugeordnet werden. Nach Aufbau der deskriptiven Kohorten Datenbank mit jeglichen Patienteninformationen (Vgl. Tab. 6), die aus der klinischen Datenbank (Agfa Orbis®) entnommen und in einer Microsoft® Excel®-Datei gespeichert wurden, konnte eine Anonymisierung an der Quelle durchgeführt und zur weiteren Verwendung freigegeben werden.

2.1.2 Deskriptive Kohortendaten

Die Kohorte besteht aus 419 Patienten, von denen 22,5% weiblich und 77,5% männlich sind. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose (ED) lag bei 62,4 Jahren.

29% der Patienten wurden nach der 7. UICC Klassifikation bei ED UICC I/II klassifiziert, 71% UICC III/IV. Für die aktuelle 8. UICC Klassifikation lag die Verteilung nach Reklassifizierung bei 41,1% UICC I/II und 58,8% UICC III/IV. Dabei lag die Verteilung für T1/T2 bei 50,2% und für T3/T4 bei 45,4%. Der Rest von 4,3% entfielen entweder auf TX oder T0. Des Weiteren hatten 42,6% der Patienten zum Zeitpunkt der ED den Status N0 und 56,9% waren bereits lymphogen metastasiert (N+). Fernmetastasiert (M1) waren bei ED lediglich (7,4%) der Patienten und 92,6% waren DM-frei (M0). Im weiteren Verlauf traten bei weiteren 6% DM auf. Weiterhin wurden 22% dem UICC I Stadium, 19,1% dem UICC II Stadium, 15,7% dem UICC III Stadium und mit 43,1% die große Mehrheit dem fortgeschrittenen UICC IV Stadium zugeordnet. In Tabelle 4 sind alle Verteilungen der neuen 8. UICC reklassifizierten Fälle aufgeführt. Hinsichtlich des Differenzierungsgrades (engl. Grading) zeigten sich bei ED 4% der PT gut differenziert (G1), die weitaus größte Mehrheit mit 73% mäßig differenziert (G2) und 23% schlecht differenziert (G3). Eine Übersicht über die verschiedenen anatomischen Lokalisationen und der Verteilung des verwendeten Gewebes zeigt die folgende Tabelle 5.

Tabelle 4: Reklassifikation nach neuer 8. UICC Edition

T-Status	Anteil (%)	N/M-Status	Anteil (%)	UICC	Anteil (%)
T0	3,6	N0	42,6	I	22,0
T1	22,6	N1	17,7	II	19,1
T2	27,6	N2	25,2	III	15,7
T3	25,0	N3	14,0	IV	43,1
T4	20,4	M0	86,6		
TX	0,7	M1	13,4		

Tabelle 5: Verteilung der anatomischen Lokalisationen

Anatomische Lokalisation	Anteil (%)
Mundraum	20,8%
Oropharynx	33,7%
Hypopharynx	12,2%
Larynx	28,6%
CUP	3,1%
Mehretagen CA	3,1%

Hier zeigt sich, dass sich die Mehrzahl der PT im Oropharynx befanden, gefolgt vom Larynx und Mundraum und zuletzt vom Hypopharynx. In 3,1% der Fälle handelte es sich um Krebs in Form von LM ohne PT (CUP). Ebenso 3,1% der Plattenepithelkarzinome traten simultan über mehrere Etagen auf und waren somit keiner genauen Lokalisation zuzuordnen.

2.1.3 Verlauf

Die Therapieoptionen umfassten nach ED zum einen die chirurgische Entfernung (78,8%), wovon 91% R0 reseziert werden konnten, und die lokale Bestrahlung (59,5%), wobei sich bei dem weitaus größten Anteil mit einer Energiedosis von zunächst 50 Gy und nach konventioneller Fraktionierung mittels Boost-Bestrahlung des Tumorbettes eine Gesamtdosis von 60-66 Gy erzielen ließ. Weiterhin wurden 30,9% der Patienten nach ED adjuvant, neoadjuvant oder monotherapeutisch mit chemotherapeutischen Medikamenten, wie Cisplatin (oder Carboplatin), 5-Fluor-Uracil und Cetuximab oder einer Kombination aus diesen, behandelt. Neue ICI Therapieoptionen kamen nicht zum Einsatz.

Im weiteren Verlauf entwickelten 25,1% der Patienten eine isolierte RD und 30% kombinierte RD und LM. Bei 6% kam es zu DM-Rezidiven. Eine 2. maligne Neoplasie, die unabhängig vom Befund des HNSCC auftrat, wurde bei 5,9% der Patienten dokumentiert.

2.1.4 Risikofaktoren

87,6% der Patienten gaben einen regelmäßigen Zigarettenkonsum an oder diesen in der Vergangenheit betrieben zu haben. Die gemittelten Zigarettenpackungsjahre (engl. pack years) unter den Rauchern lagen bei 42,6. 43,1% der Patienten beschrieben zudem regelmäßigen Alkoholkonsum.

Zum Zeitpunkt der ED lag der durchschnittliche Karnowsky Index bei 76,9%.

In 27,7% aller HNSCC und 48,9% aller oropharyngealen Karzinomen (OPSCC) wurde ein positiver p16 Status als Surrogatmarker einer HPV Infektion nachgewiesen.

Tabelle 6: Auflistung der erhobenen klinisch-pathologischen Kohorten Daten

Gewebe	Primärtumorgewebe (wenn vorhanden)
	Rezidivtumorgewebe (wenn vorhanden)
	Lymphknotenmetastasengewebe (wenn vorhanden)
	Fernmetastasengewebe (wenn vorhanden)
Patienten	Geschlecht (männlich/weiblich)
	Geburtsdatum
	Zeitpunkt der Erstdiagnose
	Lokalisation des Primarius
	Zeitpunkt des Rezidivs (falls aufgetreten)
	Zeitpunkt des Todes (falls eingetreten)
	Nikotin- (pack years) und Alkoholanamnese
	Karnowsky Index
Tumor	TNM, UICC Klassifizierung der bei ED gültigen 7. Auflage
	TNM, UICC Reklassifizierung der neuen 8. Auflage
	Grading
	RD, LM oder DM im Verlauf (wenn aufgetreten)

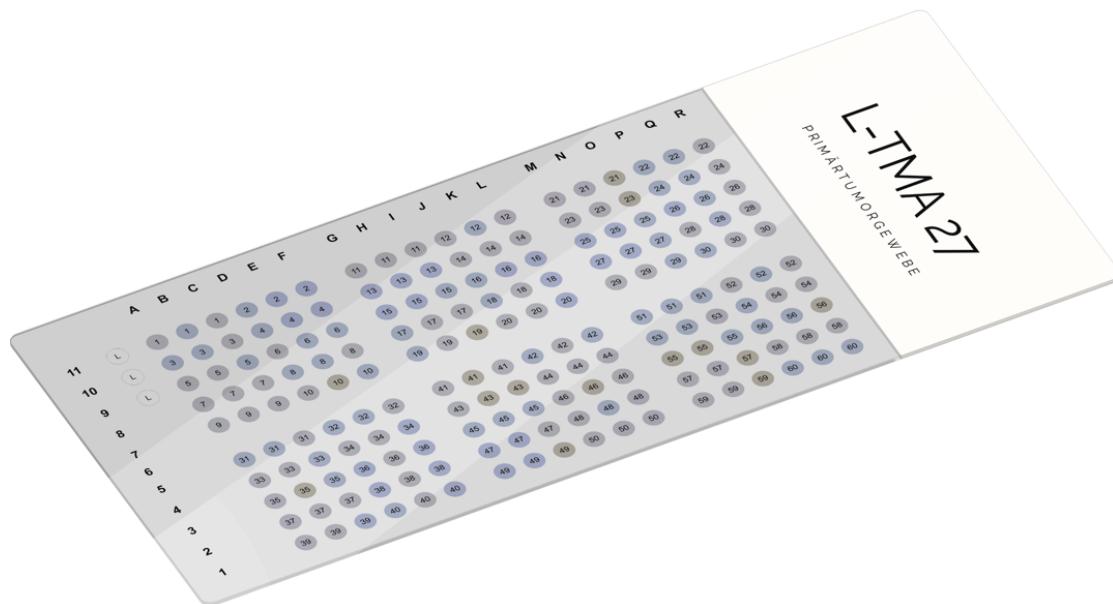
	p16 Status (pos/neg)
Therapie	OP (ja/nein)
	Bestrahlung (ja/nein, applizierte Strahlendosis)
	Brachytherapie (ja/nein), applizierte Strahlendosis)
	Chemotherapie (ja/nein, Präparat und Dosierung)

2.2 Tumorgewebe

Zunächst wurden am Mikrotom aus in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (engl. formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) HNSCC Proben 4µm starke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgetragen. Diese wurden daraufhin mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbt und anschließend von einem erfahrenen Pathologen begutachtet und gegebenenfalls reevaluiert.

2.2.1 Herstellung von Tissue Micro Arrays

Für die Herstellung der Tissue Micro Arrays wurden mithilfe des semiautomatischen Tissue Arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA) aus den Paraffin-Gewebeblöcken (Donor-Block) der HNSCC-Tumoren jeweils Stanzen mit einem Durchmesser von 0,6 mm intratumoral entnommen und daraufhin die so gewonnenen Stanzen in einem neuen Paraffinblock (Akzeptor-Block) zusammengesetzt. Die maximale Anzahl der Stanzen pro Block betrug hierbei n=60, wobei jeweils drei von diesen aus unterschiedlichen Arealen desselben Tumors nebeneinander platziert wurden. Je Akzeptor-Block wurden zudem drei Stanzen mit Kontrollgewebe aus der Leber über der ersten Reihe der Stanzen mit angelegt. Zuletzt erfolgte am Mikrotom die Anfertigung von 4µm starken Schnitten, die wiederum auf Objektträger übertragen wurden. Folgende Abbildung zeigt beispielhaft den Aufbau eines Tissue Micro Arrays mit Primärtumorgewebe aus der Lübecker HNSCC-Kohorte.

Abbildung 1: Bsp. eines Lübecker Tissue Micro Arrays (L-TMA 27)

L: Leberkontrollgewebe

2.2.2 Immunhistochemische Färbung

2.2.2.1 Prinzip

Mittels Immunhistochemie (IHC) lassen sich molekulare Strukturen in histologischen Gewebeschnitten darstellen. Dies wird mit Hilfe von speziell farblich markierten Antikörpern (Marker) erreicht, die spezifisch an Zell-Strukturen (Antigene) binden und dadurch indirekt deren Expression durch ein entstehendes Farbsignal anzeigen. Entsprechend der Antigen-Antikörper-Reaktion bindet ein Antigen dabei an spezifische Antikörperstrukturen, sodass für die Detektion eines Antigens auch ein spezifischer Antikörper vonnöten ist. Allgemeinhin wird davon ausgegangen, dass sich die Antigenexpressivität, also die Häufigkeit des zu bestimmenden Antigens in dem untersuchten Gewebe, durch die Färbeintensität indirekt darstellen lässt. Im Unterschied zum Proteinnachweis, zum Bsp. mittels ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent-assay), bietet die IHC den Vorteil, Antigenstrukturen genau dort zu identifizieren, wo sie in der Zelle auch vorkommen, um darüber genauere Aussagen über die Funktion und Wirkung der spezifischen Proteine herleiten zu lassen [67]. Um die Strukturen in dem zunächst fixierten Gewebe freizulegen und anzufärben, erfolgen IHC-Färbungen dabei immer nach einem für den spezifischen Antikörper festgelegten Ablauf (Färbeprotokoll).

2.2.2.2 Antikörper

Für die Darstellung von EVI1 wurde ein monoklonaler aus der Maus stammender und gegen humanes Gewebe gerichteter Antikörper (monoclonal, anti-rabbit clone C50E12, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Das iView DAB Detection Kit von Ventana wurde in diesem Zuge als indirekter Anitikörpernachweis und ein BenchMark (Roche, Basel, Schweiz) Färbeautomat für die Durchführung genutzt. Das Gelingen der Färbung wurde durch Objektträger mit Gewebe einer Positivkontrolle im Rahmen der Etablierung sichergestellt.

2.2.2.3 Färbeprotokoll für EVI1

Die Entparaffinierung der Gewebeschnitte erfolgte ohne Alkohol und Xylol mit EZ Prep (10x) Concentrate der Firma Roche (Referenznummer: 950-102) bei 72°C. Daraufhin erfolgte das Erhitzen des Schnittes innerhalb von 4 Minuten auf 94°C zur Demaskierungsbehandlung der durch die Formalinfixation verdeckten Antigene in einem CC1 Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) der Firma Roche (Referenznummer: 950-224) mit dem pH-Wert 8,4. Für EVI1 wurde der Schnitt daraufhin weitere 64 Minuten mit CC1 inkubiert. Nach Abschluss der Demaskierung erfolgten dann die eigentlichen Färbeschritte durch das händische Auftragen des mit Ventana Antibody Diluent (Referenznummer: 760-219) verdünnten Antikörpers, denen sich eine weitere Inkubationszeit von 48 Minuten bei 37°C anschlossen. Für die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte eine Hämatoxylin-Färbung nach Mayer (Referenznummer: 790-2208) für 8 Minuten und Bluingreagent-Spülung (Referenznummer: 760-2037) für weitere 4 Minuten. Zuletzt wurden die Gewebeschnitte eingedeckt, nummeriert und entsprechend Abbildung 1 gekennzeichnet.

2.2.3 Histologische Auswertung

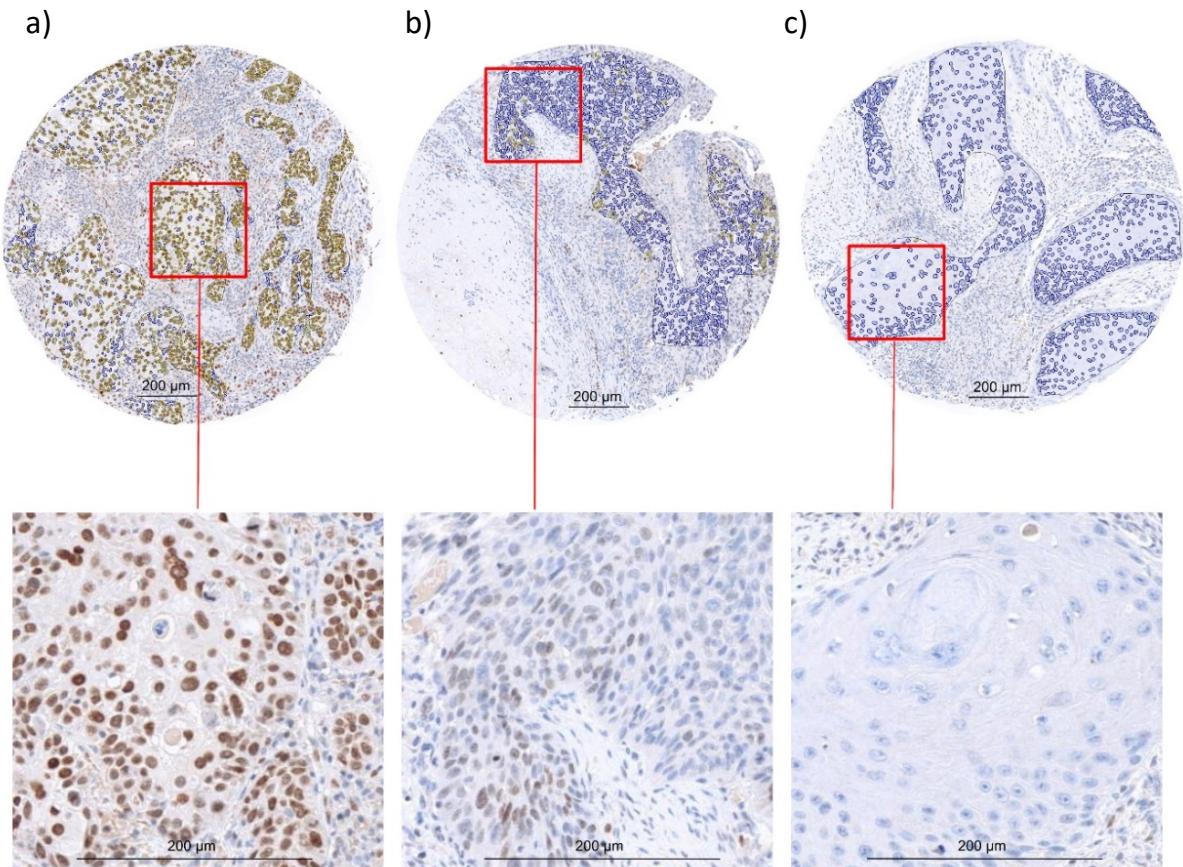
2.2.3.1 EVI1 Expressionswert

Die für EVI1 gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe des Ventana iScan HT Scanners (Ventana, Tuscon, AZ, USA) ultrahochauflösend gescannt und digitalisiert. Zur weiteren digitalen Quantifizierung der Expression des nukleären Rezeptors wurde die Bildanalysesoftware Tissue Studio® (Definiens® Developer XD 2.0, Definines Inc, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Dieses Programm ermöglicht es dem Nutzer Zellkompartimente, wie Zellkern, Zytoplasma,

Zellmembranen oder auch ganze Zellen innerhalb eines Gewebe-Cores zu definieren und diese auf ihre Färbeintensität und -verteilung hin zu untersuchen. Hierfür wurde unter Anleitung eines erfahrenen Pathologen innerhalb jedes gestanzten Tumor Cores manuell die zu untersuchende Region, eine sogenannte „Region of Interest“ (ROI), um den Tumorzellbereich gezirkelt, um das umliegende benigne Stromagewebe von der Auswertung auszuschließen. Innerhalb dieses Bereiches konnten nun die Zellkernmembranen erkannt und anhand der analysierten Intensität der immunhistochemischen Färbung ein Intensitätsspektrum erstellt werden, um einen fortlaufenden Wert für die mittlere Expressivität des Markers zu generieren (mean brown). Dieser einheitslose Wert reichte dabei von 0 bis maximal 40. Da sich die Expression des Markers auch innerhalb eines Tumorcopes teilweise sehr heterogen verteilte wurde zusätzlich ein Positiv/Negativ-Wert (positive index) erhoben, der die Anzahl der EVI1-exprimierenden Zellen in Relation zu allen Tumorzellen setzte. Dazu wurde zunächst ein Schwellenwert für die Färbeintensität definiert, der zwischen EVI1 positiv exprimierenden und negativ exprimierenden Zellkernmembranen unterscheidet und einem „mean brown“-Wert von 1 entspricht. Dieser Schwellenwert markiert dabei den Expressionswert, ab dem 2 unabhängige und erfahrene Pathologen eine positive Expression bestätigt haben und wurde dafür vor der Analyse speziell definiert. Der daraus generierte und ebenfalls einheitslose Verteilungswert ermöglichte dabei die Miteinbeziehung der intertumorösen Expressionshomogenität und reichte dabei von 0 bis maximal 80. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 2 jeweils ein Beispiel für ein Stanz-core mit homogener a), heterogener b) und ausbleibender nukleärer Expression c) von EVI1 nach Annotation der ROI und Expressionsanalyse durch Tissue Studio® Definiens® und einem Beispielausschnitt in 20-facher Vergrößerung. Die gelb umrandeten Nuclei stehen dabei für von Tissue Studio® Definiens® als positiv erkannte und die blau umrandeten Nuclei als negativ erkannte Zellkompartimente.

Abbildung 2: Tumorcores nach Zirkelannotation und Analyse durch Definiens mit Beispielausschnitten für homogene a), heterogene b) und keine Expression c)

20x Vergrößerung



Zuletzt wurden diese beiden unabhängigen Werte miteinander multipliziert, um somit für die statistische Auswertung einen alleinstehenden Expressionswert (engl. expression score) aufzustellen, der die Färbeintensität und die Verteilung der EVI1 Positivität miteinander vereint. Der höchste Expressionswert lag hierbei bei 2969, sodass die Verteilung zwischen 0 und maximal 3000 für diesen Wert definiert wurde. Mit Ausnahme der Digitalisierung der einzelnen TMAs wurden alle Schritte der digitalen Analyse an dem gleichen Computer (Windows 7, 24“ Monitor mit einer Auflösung von 1920x1080) durchgeführt.

2.2.3.2 Intratumorale Immunzellverteilung (cold/hot/excluded-Schema)

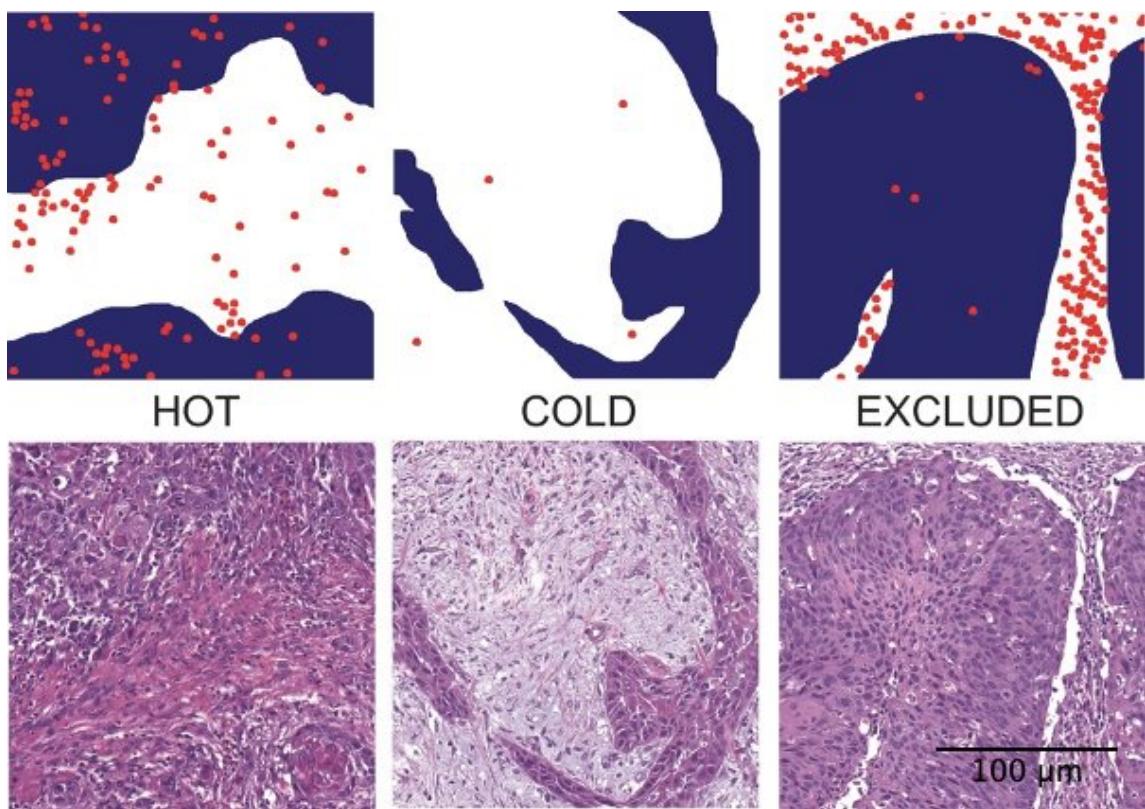
Für die Kategorisierung des Immunzellverteilungsstatus innerhalb des TIME wurde die bereits vorbeschriebene Methode der Unterteilung in 3 Gruppen, die als cold, hot oder excluded definiert werden, gewählt [68]. Die Auswertung wurde an den HE-gefärbten Schnitten (engl. whole slides) von den Patienten, die als Erstlinientherapie eine Tumorresektion erhielten (n=289), durchgeführt. Dies erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Auswertungen durch erfahrene Pathologen, bzw. unter Anleitung eines erfahrenen Pathologen, und wurde hinsichtlich der Übereinstimmung untersucht. Diese lag bei 96% (n=276) der Fälle. In den restlichen Fällen wurde ein dritter Pathologe (Direktor des Instituts) für eine endgültige Entscheidung hinzugezogen. Für die lichtmikroskopische Arbeit wurde ein Olympus BX50 Mikroskop mit Fluorit-Objektiv und Plano-Korrektur (Olympus Europa, Hamburg, Germany) genutzt. Die Kriterien für die Unterteilung in die jeweilige Gruppe lassen sich hierbei der folgenden Tabelle 7 entnehmen.

Tabelle 7: Kriterien des Immunzell-Verteilungsstatus

hot	> 2% Tumor-Immunzellanteil, von dem sich mehr als 50% innerhalb des Tumorgewebes, also zwischen den tumorösen Zellen oder dem Tumorstroma befindet
cold	Bis zu 1% Tumor-Immunzellanteil innerhalb des gesamten Präparates
excluded	> 2% Tumor-Immunzellanteil, von dem sich mehr als 50% innerhalb des desmoplastischen Stromagewebes befindet

Zur Veranschaulichung enthält die nächste Abbildung beispielhaft für jede Kategorie eine schematische Darstellung der Immunzellverteilung und den zugehörigen Bildausschnitt des HE gefärbten Tumorgewebes.

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Immunzellverteilung im Vergleich zu den zugehörigen HE gefärbten Tumorausschnitten



2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung des digitalen Statistikprogrammes IBM® SPSS® Statics für IOS® (Version 21, 2012, 64-Bit, IBM® Corp., Armonk, NY, USA).

Zunächst wurden damit explorative Datenanalysen und deskriptive Statistik durchgeführt um, Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der klinischen Kohortendaten und weiterhin der Expressionswerte von EVI1 und der Immunzellverteilung des TIME zu bestimmen. Außerdem wurden Varianzanalysen (engl. analysis of variance, ANOVA) durchgeführt, um zum einen die unterschiedlichen EVI1 Expressionswerte der verschiedenen Primärtumorlokalisationen und der verschiedenen UICC Stadien zu vergleichen und den Unterschied der EVI1 Expression und der Immunzellverteilung in p16 positiven und p16 negativen PT herauszustellen. Ebenso fand dieser Test im Vergleich der PT mit und ohne LM und im Vergleich zwischen PT, LM, DM und RD untereinander weitere Anwendung. Der gepaarte Zweistichproben-T-Test wurde für den Vergleich der EVI1 Expression von zueinander

gehörigen PT und LM gewählt. Gesamtüberlebenszeitanalysen und krankheitsfreies Überleben wurden mittels Log-Rank-Test errechnet und wahlweise per Kaplan-Meier-Verfahren in 5-Jahres Überlebenskurven oder Balkendiagrammen graphisch dargestellt. Die Patienten, die sich der Nachbehandlung entzogen haben und bei denen aus diesem Grund keine Überlebensdaten zu erheben waren, wurden in diesen Analysen censiert. Die Verteilung der EVI1 Expression und der Immunzellmuster wurden hinsichtlich Tumorlokalisierung in Balken- oder Tortendiagrammen dargestellt. Für den Vergleich der Immunprofile cold, hot und excluded und prognostischer Einflussgrößen, wie UICC Klassifikation, T-Stadium, p16-Status, RD und DM, wurden zudem univariate und multivariate Cox-Regressions-Analysen zur Darstellung der Unabhängigkeit der prognostischen Wertigkeit gegenüber anderer Faktoren durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte <0,05 definiert. Den dargestellten Balkendiagrammen sind Mittelwerte und 95%-Konfidenzintervalle zu entnehmen.

Für die Anpassung der graphischen Datenvisualisierung wurde folgende Software verwendet: Inkscape® (version 0.92.4, The Inkscape Project c/o Software Freedom Conservancy, Brooklyn, NY, USA, <https://inkscape.org/>), Krita® (version 4.2.8, Stichting Krita Foundation, Deventer, The Netherlands, <https://krita.org>), GIMP® (version 2.10.14, The GIMP Project c/o GNOME Foundation, Orinda, CA, USA, <https://www.gimp.org>).

Für die Erstellung des Beispiel-TMA wurde Vectorworks® 2019 SP6 R1 (Build 522773, 64-bit, Vectorworks Inc. Nemetschek Group, München, DE, <https://www.nemetschek.com>) genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Kohorte

3.1.1 5-Jahres Überlebens Analysen der Lübecker HNSCC Kohorte

Das 5-Jahres Gesamtüberleben der Kohorte verhielt sich im Vergleich der unterschiedlichen Kategorien entsprechend Abbildung 4. Karzinome der Mundhöhle wiesen hier gefolgt von denen des Hypopharynx die geringste mittlere Gesamtüberlebenszeit auf, jene des Oropharynx und des Larynx dahingegen eine etwas längere. Außerdem wurden in univariaten Cox Regressionsrechnungen die prognostische Wertigkeit der einzelnen Kategorien erhoben, um Rückschlüsse auf die Veränderung des relativen Risikos hinsichtlich eines früheren Ablebens zu ermöglichen. Eine Tabelle der Regressionsergebnisse findet sich im Appendix (App. 1). Das mittlere Gesamtüberleben der gesamten Kohorte unabhängig jeglicher Untergruppierung lag dabei bei 61,9% nach 5 Jahren.

3.1.2 Lokalisationen im Vergleich

Betrachtet man die unterschiedlichen Lokalisationen der HNSCC und deren spezifische Überlebensdaten, so ergeben sich die schletesten Prognosen für das mittlere Gesamtüberleben nach 5 Jahren für Karzinome des Mundraumes (51,8%) und den Hypopharynx (54,8%). Karzinome des Oropharynx (65%) und des Larynx (67,2%) zeigten diesbezüglich etwas längeres Gesamtüberleben (Vgl. Abb. 4a)). Auf Grund der niedrigen Anzahl an CUP (3,1%) und Mehretagenkarzinomen (3,1%) finden diese in der gemittelten Überlebensanalyse keine Erwähnung.

3.1.3 UICC Stadien der 7. und 8. Generation im Vergleich

Im nächsten Schritt wurde die Anwendbarkeit des Prognosefaktors UICC Stadium auf die Kohorte jeweils für die veraltete 7. UICC Klassifikation und die reevaluierte 8. UICC Klassifikation überprüft. Dabei zeigte sich in der ersteren ein wellenförmiger Verlauf der Balkendiagramme mit einem gemittelten 5-Jahres Gesamtüberleben von 75,6% für UICC I auf 67,7% für UICC II und einem erneuten Anstieg auf 75,6% für UICC III mit finalem Abstieg auf 51,6% für UICC IV. Im Unterschied dazu lässt sich der Verlauf der Balkendiagramme für die neuere UICC Klassifikation eher in stetig abfallender Tendenz beschreiben, in der sich UICC II

(71,8%) und UICC III (72,6) stärker annähern und UICC I mit 79,7% und UICC IV mit gerade mal 44,3% deutlichere Extreme anzeigen (Vgl. Abb. 4b)). In einer anschließenden univariaten Cox Regression bestätigte sich zudem der prognostische Einfluss hinsichtlich des 5-Jahres Gesamtüberlebens für die 8. UICC Generation ($HR=1,534$; $p=<0,001$). Dieser Einfluss war auch für die 7. Generation statistisch zu errechnen ($HR=1,370$; $p=<0,001$).

3.1.4 Lokalrezidiv (RD)

Auch das Auftreten einer RD zeigte hier einen signifikanten ($p=<0,01$) Einfluss (Siehe Pfad a in Abb. 4c)). Durchschnittlich dauerte es 36,2 Monate von ED bis zum Zeitpunkt der RD und führte bei diesen zu einem mittleren Gesamtüberleben nach 5 Jahren von annähernd der Hälfte der Betroffenen (55,9%). Demgegenüber waren in der Gruppe der Patienten, die keinen lokalen Tumorrückfall erlitten nach 5 Jahren in etwa 2/3 noch am Leben (64,4%). Überdies dauerte es durchschnittlich weitere 25,5 Monate bis zum Ableben der Patienten. In der weiteren Untersuchung der prognostischen Wertigkeit für das mittlere 5-Jahres Gesamtüberleben wurde in der Cox Regression ein signifikanter Unterschied bestätigt ($HR=1,224$; $p=0,042$).

3.1.5 Lymphknotenmetastasen (LM)

Das Auftreten von gleichzeitigen LM führte zu keinem signifikanten Unterschied hinsichtlich des mittleren 5-Jahres Gesamtüberlebens (Vgl. Abb. 4c)).

3.1.6 Fernmetastasen (DM)

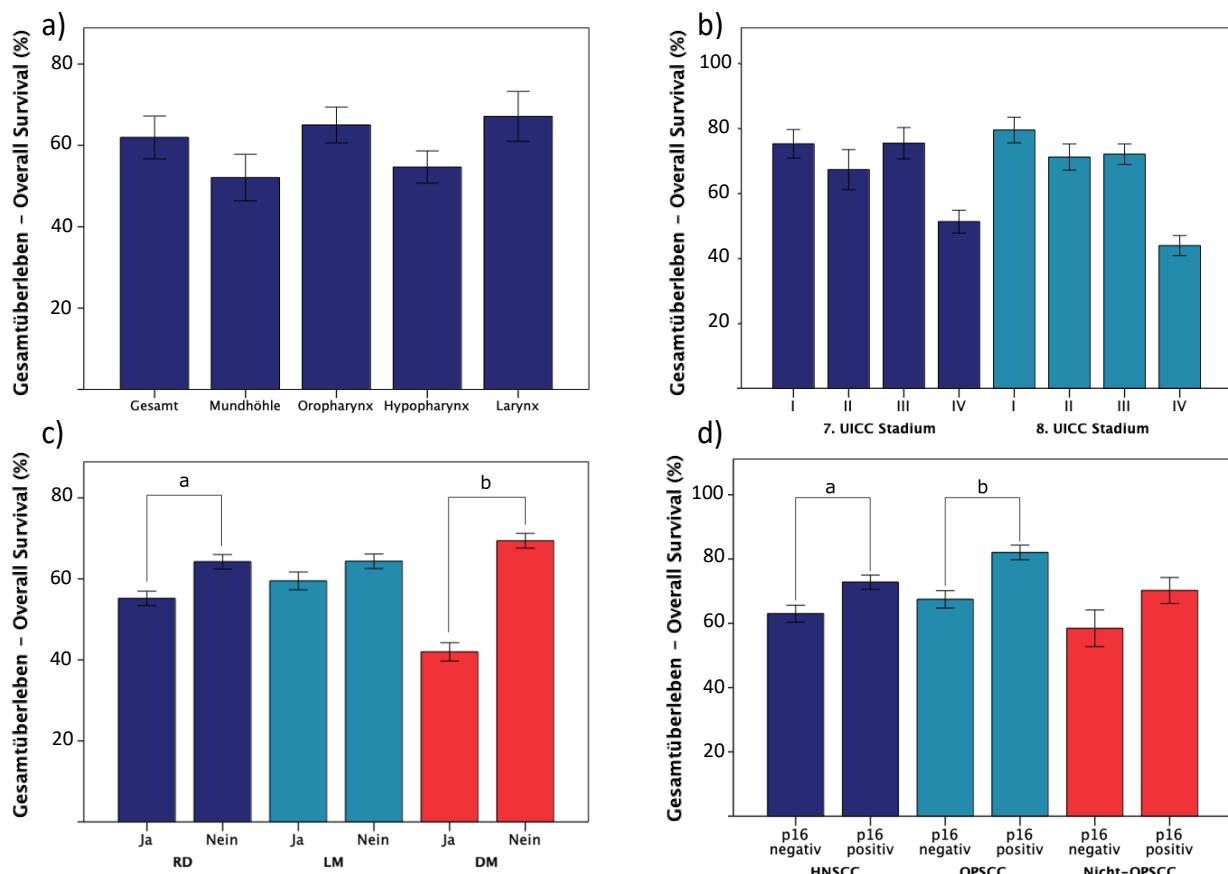
Das Auftreten einer DM bei ED verkürzte das mittlere Gesamtüberleben der Patienten signifikant ($p=<0,001$) und lässt sich graphisch in Pfad b Abbildung 4c) nachvollziehen. Dabei zeigte die Gruppe der Patienten ohne DM ein Gesamtüberleben von 69,7% nach 5 Jahren, in der Gruppe mit DM 42,3%. Kam es im weiteren Verlauf zu einer DM zeigte diese Gruppe ebenfalls ein signifikant niedrigeres Gesamtüberleben ab ED von 51,7%. Die univariate Cox Regression bestätigte hier den prognostischen Einfluss des Auftretens einer DM ($HR= 1,445$; $p=0,001$).

3.1.7 p16 Status

Im Vergleich des p16 Status führte ein positiver gegenüber einem negativen Befund in den OPSCC zu einem signifikant ($p=0,001$) verlängerten mittleren Gesamtüberleben nach 5 Jahren von 67,1% zu 82,4% (Siehe Pfad b, Abb. 4d)). Vergleicht man das Gesamtüberleben der gesamten HNSCC Kohorte anhand des p16 Status zeigt sich ebenfalls ein signifikanter ($p=0,002$) Unterschied (Siehe Pfad a, Abb. 4d)). In der univariaten Cox Regression ließ sich auch hier sowohl isoliert für die OPSCC ($HR=0,435$; $p=0,004$) als auch für alle HNSCC ($HR=0,516$; $p=0,001$) signifikante prognostische Einflüsse auf das Gesamtberleben darstellen. Zusätzlich bestätigte die multivariate Cox Regression die Unabhängigkeit dieses prognostischen Faktors gegenüber anderen signifikant prognosebestimmenden Faktoren wie dem UICC Status, dem T Stadium, dem Auftreten einer RD oder einer DM für HNSCC ($HR=0,516$; $p=0,001$) und OPSCC ($HR=0,485$; $p=0,004$; Vgl. App. 2). Nicht-OPSCC haben hinsichtlich ihres positiven p16 Status keinen signifikanten Überlebensvorteil gezeigt, obgleich sich eine Tendenz in die gleiche Richtung abzeichnetnet (Vgl. Abb. 4 d)).

Abbildung 4: Mittleres Gesamtüberleben nach 5 Jahren im Vergleich zwischen Lokalisationen a), UICC Stadien der 7. Und 8. Edition b) RD-, LM-, DM Status c), und p16 Status für HNSCC, OPSCC und nicht-OPSCC d)

Fehlerbalken beschreiben 95%-Konfidenzintervalle



3.1.8 Grading, Alter, Geschlecht

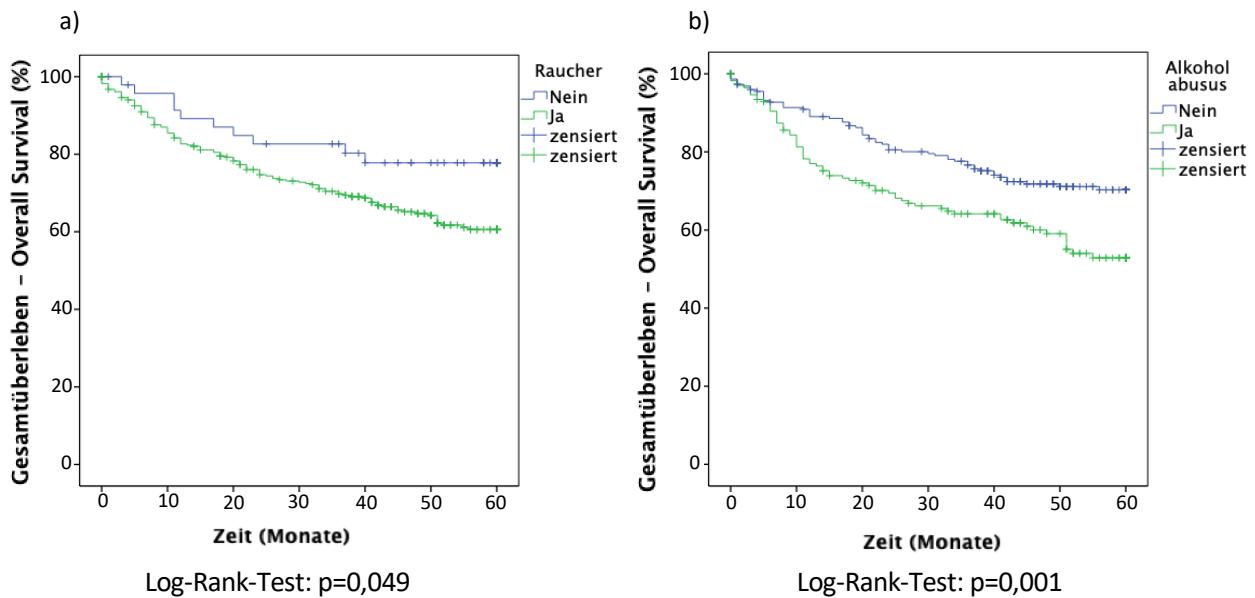
In der Analyse des prognostischen Einflusses auf das 5-Jahres Überleben zeigten sich in der univariaten Cox Regression die Einflussfaktoren Grading ($HR=1,239$; $p=0,354$), Alter ($HR=1,324$; $p=0,165$) und Geschlecht ($HR=1,153$; $p=0,556$) als statistisch nicht signifikant (Vgl App. 1).

3.1.9 Exogene Risikofaktoren im Vergleich

Betrachtet man den Einfluss der exogenen Risikofaktoren Rauchen und Alkoholabusus auf das Mittlere 5-Jahres Überleben zeichnet sich folgendes Bild: Patienten, die anamnestisch

darüber berichteten Raucher zu sein oder in der Vergangenheit geraucht zu haben, hatten ein signifikant ($p=0,049$) niedrigeres Überleben, was graphisch in Abbildung 5a) dargestellt wird. Ebenso signifikant niedriger ($p=0,001$) war das Überleben unter den Patienten, die über regelmäßigen Alkoholabusus berichteten (Vgl. Abb. 5b)).

Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurven für mittleres 5-Jahres-Gesamtüberleben hinsichtlich der Raucheranamnese a) und des Alkoholabusus b)



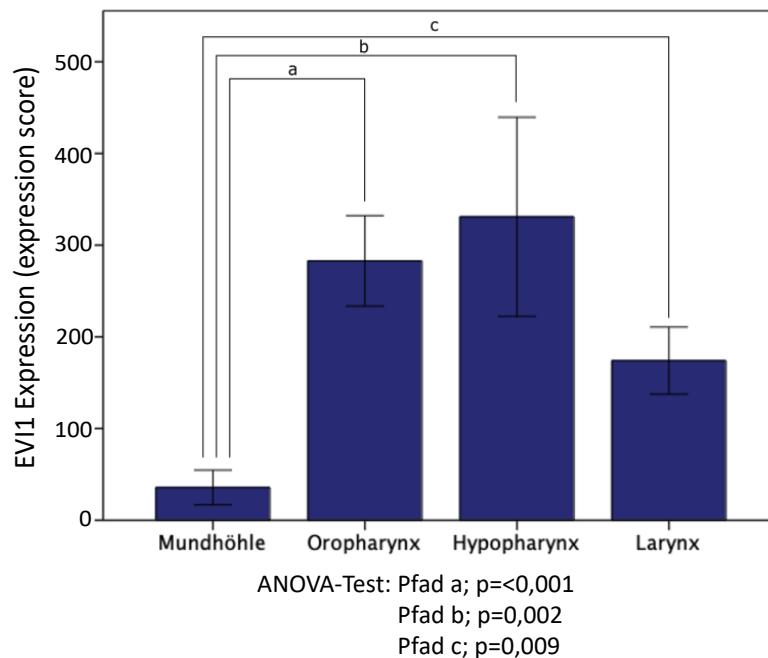
3.2 Die Rolle der EVI1 Expression für HNSCC

3.2.1 Unterschiedliche EVI1 Expression in verschiedenen Lokalisationen

Die EVI1 Expression wurde an den unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen der HNSCC bestimmt. Die höchste durchschnittliche Expression zeigte sich hier in den PT des Hypopharynx, gefolgt von denen des Oropharynx. Eine mittlere durchschnittliche Expression fand sich darauffolgend in HNSCCs des Larynx und die geringste in denen der Mundhöhle. Ebenda ließen sich im Vergleich zu allen anderen Lokalisationen statistisch signifikant niedrigere Expressionswerte erheben: Abbildung 6 zeigt dazu ein Balkendiagramm, welches über die Pfade a ($p= <0,001$), b ($p=0,002$) und c ($p=0,009$) die signifikant unterschiedlichen Relationen der Expressionsverteilung kennzeichnet.

Abbildung 6: EVI1 Verteilung über die verschiedenen HNSCC Lokalisationen

Fehlerbalken beschreiben 95%-Konfidenzintervalle



3.2.2 Höhere EVI1 Expression in bereits bei ED metastasierten Primarien

Des Weiteren wurde die EVI1 Expression der PT, die bereits zum Zeitpunkt der ED mindestens eine LM entwickelt hatten (N+) mit PT verglichen, die zu diesem Zeitpunkt keinen positiven Lymphknotenstatus aufwiesen (N0). PT mit N+ zeigten dabei einen signifikant höheren Expressionswert als PT mit N0 ($p=0,021$). Pfad a in Abbildung 4 veranschaulicht dies graphisch.

3.2.3 Höhere EVI1 Expression in PT gegenüber korrespondierender LM

Im Vergleich der Expressionswerte zwischen PT und den zugehörigen LM innerhalb desselben Patienten wiesen die PT einen ebenso signifikant höheren Expressionswert auf als die korrespondierenden LM ($p=0,045$). Zur graphischen Veranschaulichung zeigt dafür Abbildung 7 in Pfad b den Unterschied der gemittelten Expressionswerte des korrespondierenden Gewebes für jeweils einen PT und die zugehörige LM. Abbildung 8 zeigt exemplarisch Bildausschnitte aus einem PT und der zugehörigen LM. Hier lässt sich der deutliche Unterschied der Färbeintensität zwischen dem korrespondierenden Gewebe bereits durch einen direkten Vergleich erkennen.

Abbildung 7: Vergleich der EVI1 Expression zwischen PT/N0 und PT/N+ (Pfad a) und zwischen PT und korrespondierender LM (Pfad b)

Fehlerbalken beschreiben 95%-Konfidenzintervalle

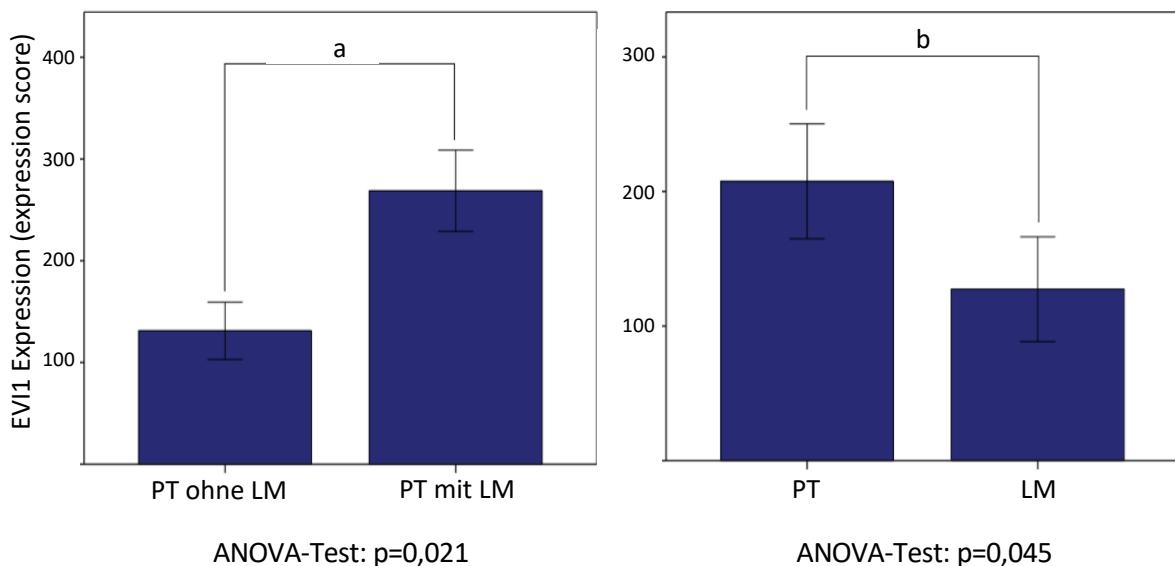
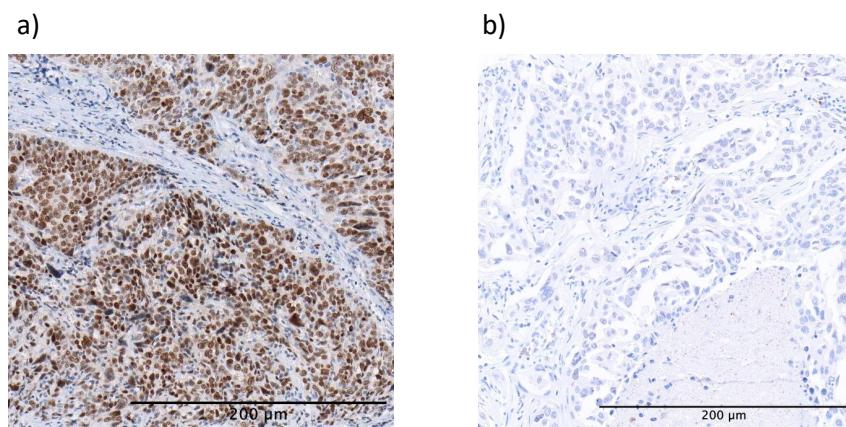


Abbildung 8: Beispieldausschnitte für unterschiedliche EVI1 Expression im PT a) zu korrespondierender LM b)

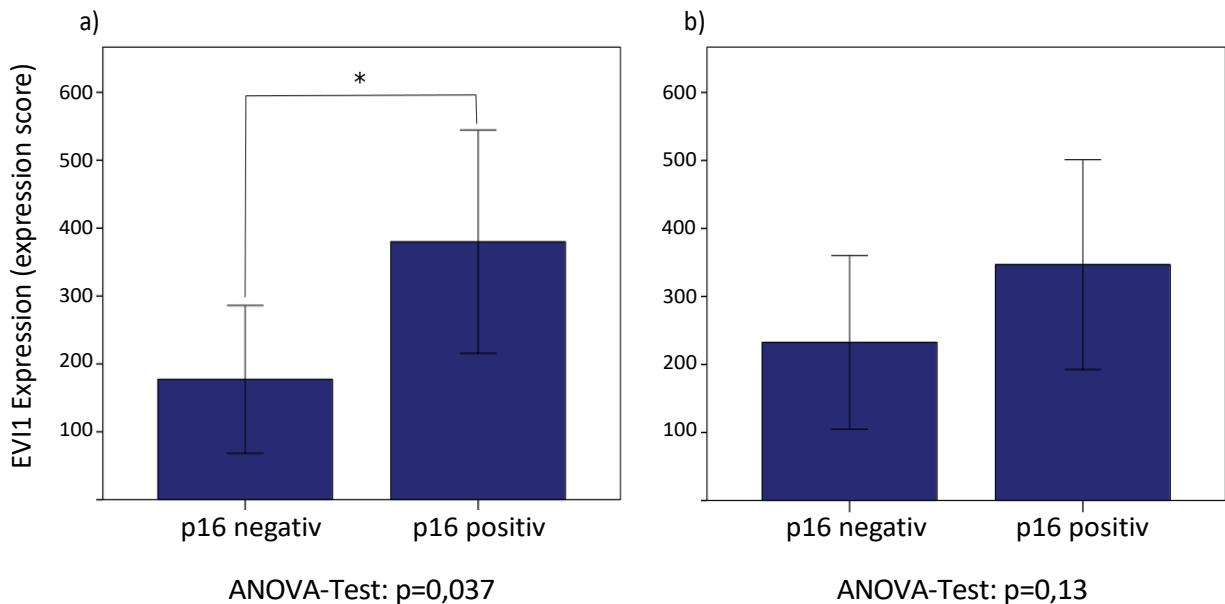


3.2.4 Höhere EVI1 Expression in p16 positiven HNSCC Primarien

In der Korrelation der p16 positiven und p16 negativen HNSCC-PT hinsichtlich ihrer Expression für EVI1 erwies sich ein signifikant höherer Wert (vgl. Pfad *, p=0,037) für die Tumore, die

einen positiven p16 Status aufwiesen und somit auf eine HPV induzierte Karzinogenese hinwiesen (vgl. Abb. 9a)). In der Subkohorte der OPSCC zeigt sich dies nicht signifikant, jedoch zeichnet sich ein Trend in die gleiche Richtung ab (vgl. Abb 9b)). 55 der OPSCC wurden dabei p16 positiv, 70 p16 negativ getestet. Die übrigen 8 OPSCC Proben konnten auf Grund von Zerstörung beim Übertragen auf die Objektträger nicht ausgewertet werden. Auch unterhalb der anderen Tumorlokalisationen ließen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des p16 Status ermitteln. Alle zeigten jedoch den gleichen Trend wie auch die OPSCC.

Abbildung 9: Vergleich der EVI1 Expression in p16 negativen und p16 positiven HNSCC a) und OPSCC b)

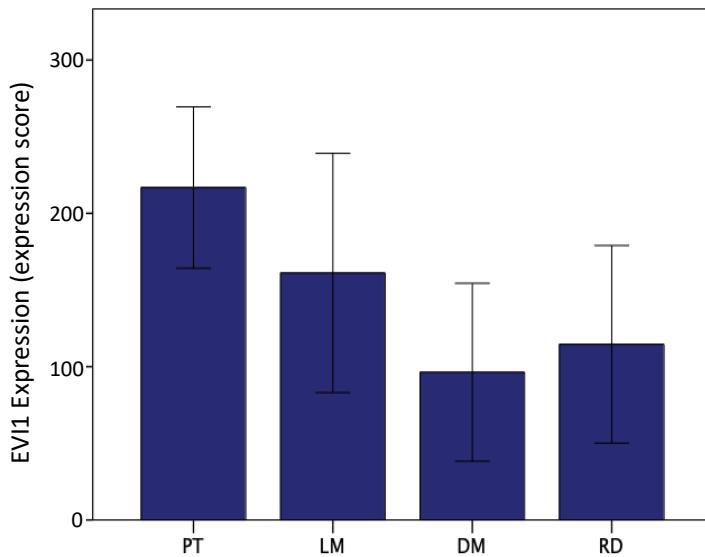


3.2.5 Trend für EVI1 Expressionsabfall entlang des Metastasierungsweges

Signifikante Unterschiede entlang des Metastasierungsweges waren in der Gegenüberstellung der Expressionswerte zwischen PT (unabhängig vom LM-Status, n=335), metastatischem Gewebe in den Lymphknoten (n=169) und den DM (n=25) nicht zu erheben. Betrachtet man jedoch die Verteilung der mittleren Expressionswerte in Abbildung 10 so lässt sich ein Trend eines Expressionsabfalls erkennen, der von einem anfänglich höheren Niveau der PT über die LM bis hin zu den DM abnimmt. Ebenso wenig signifikant unterschiedlich zeigte sich die Korrelation des RD im Vergleich zum restlichen Gewebe.

Abbildung 10: Vergleich der EVI1 Expression in verschiedenen Tumorgeweben

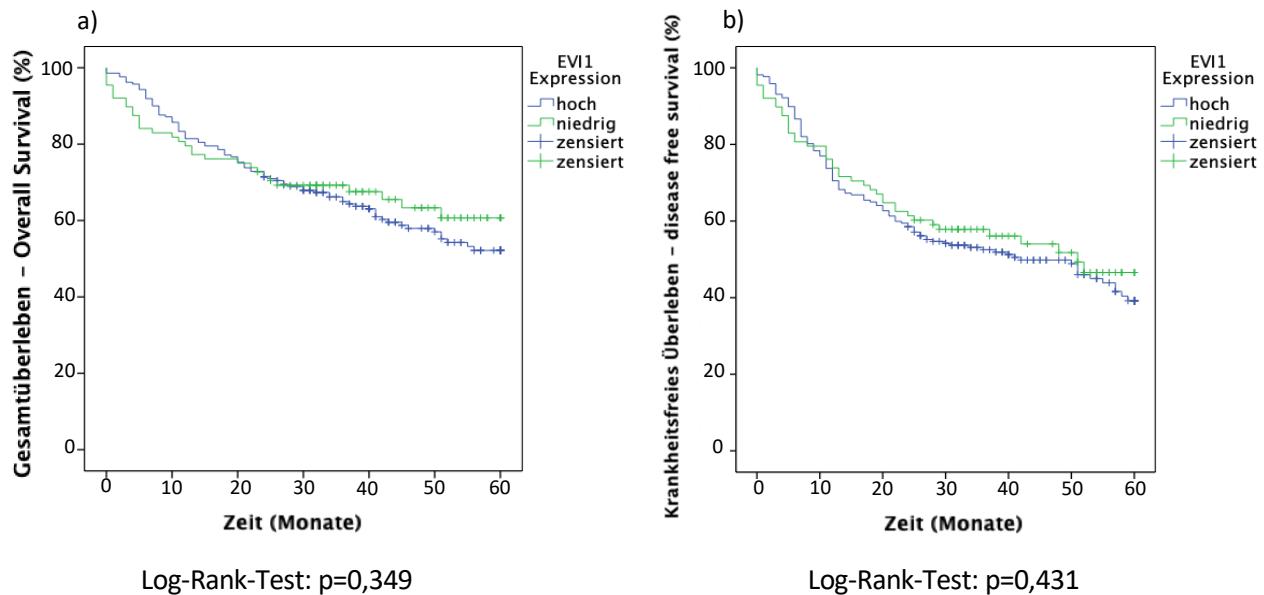
Fehlerbalken beschreiben 95%-Konfidenzintervalle



3.2.6 EVI1 in HNSCC korreliert nicht mit dem Patientenalter, UICC Stadium, dem mittleren Gesamtüberleben, dem mittleren krankheitsfreien Überleben und hat keinen Einfluss auf die Prognostik unterschiedlicher Therapieregime

Das mittlere Alter der Kohorte beträgt 62,4 Jahre. In Gegenüberstellung der EVI1 Expressionswerte des PT-Gewebes zwischen Patienten unterhalb und oberhalb dieses Alters waren keine signifikanten Unterschiede zu erheben. Des Weiteren blieben auch die Korrelationen der EVI1 Expressionswerte unterhalb der verschiedenen UICC Stadien ohne signifikante Unterschiede. Abbildung 11 zeigt Kaplan-Meier Kurven für das mittlere Gesamtüberleben (a)) nach 5 Jahren und das mittlere krankheitsfreie Überleben (b)) nach 5 Jahren im jeweiligen Vergleich zwischen EVI1-hochexprimierenden und EVI1-niedrigexprimierenden PT. Expressionswerte oberhalb des Mittelwertes des expression scores (206,8) wurden dabei als hoch, unterhalb des Mittelwertes als niedrig definiert. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurven für mittleres 5-Jahres Gesamtüberleben a) und mittleres 5-Jahres-krankheitsfreies Überleben b)

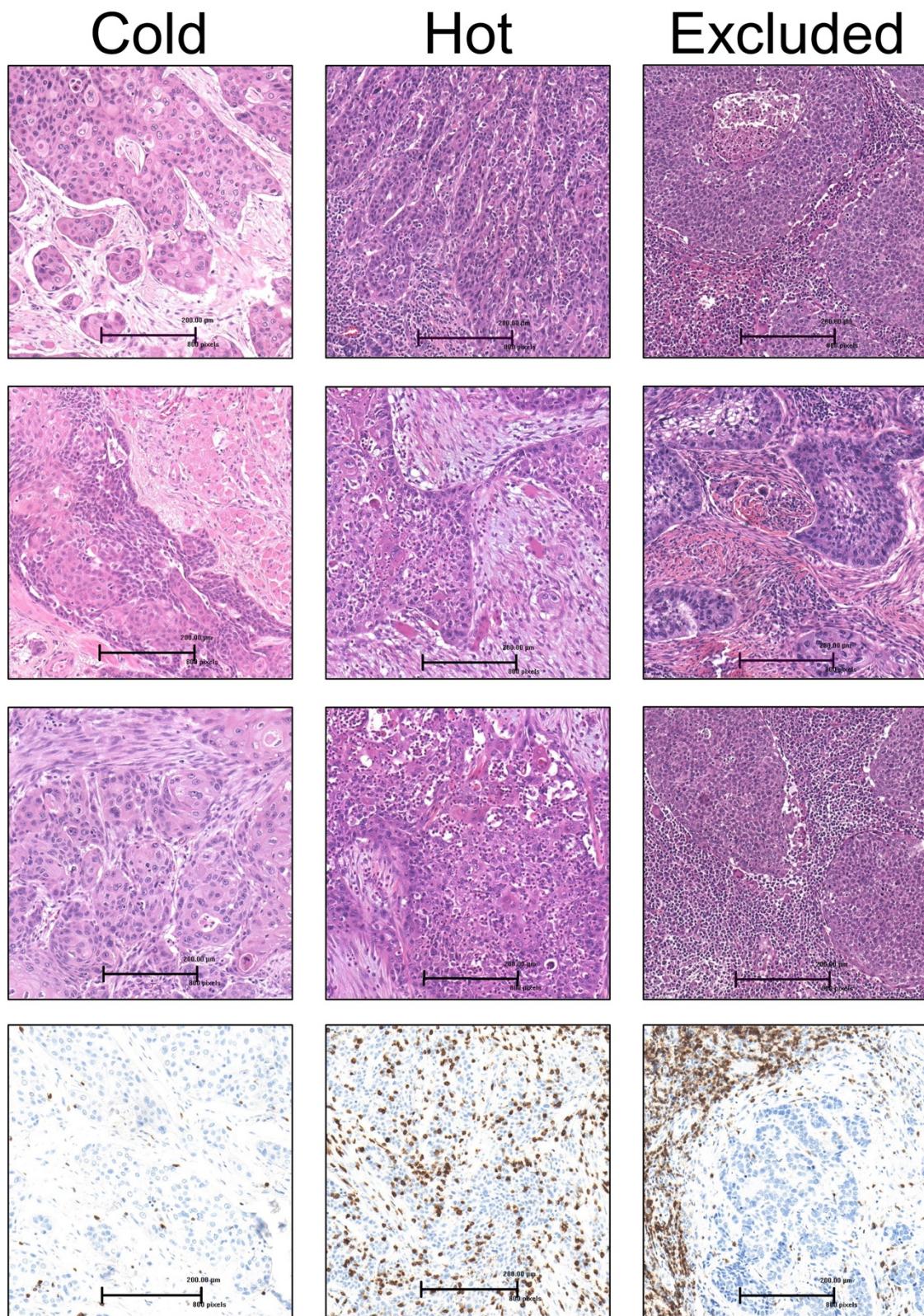


In der Betrachtung unterschiedlicher Therapieregime, wie monotherapeutisch operativer Therapie gegenüber adjuvanter Bestrahlung und adjuvanter Radiochemotherapie, konnte kein Einfluss der EVI1 Expression auf das mittlere Gesamtüberleben oder das mittlere krankheitsfreie Überleben dargestellt werden.

3.3 Die Beschreibung des TIME anhand von HE Färbungen

289 Patienten wurden durch eine primär-operative Entfernung des PT behandelt. Ebenso operativ entfernt wurden 42 RD. Dieses Gewebe wurde anhand von HE Färbungen hinsichtlich der Immunzellverteilung in die Kategorien hot, cold oder excluded unterteilt. In Abbildung 12 sind Beispiele für die einzelnen Verteilungskategorien aufgeführt. Zusätzlich ist ein Beispiel für die Verteilung von lymphozytären Immunzellen mittels CD3-Färbung aufgeführt, um einen Überblick und einen Vergleich hinsichtlich der spezifischen T-Zell-Infiltration zu ermöglichen.

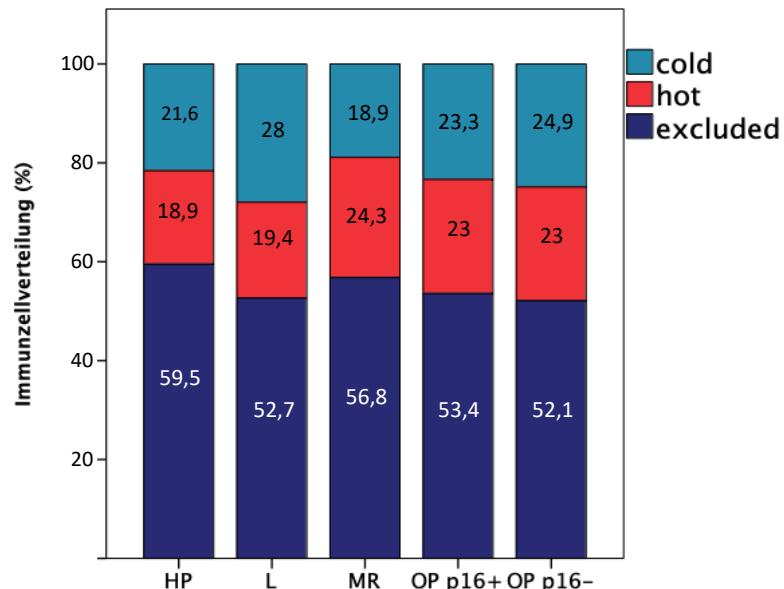
Abbildung 12: Beispiele der TIME Kategorien cold, hot und excluded mit Ergänzung der lymphozytären Verteilung (CD3)



3.3.1 Immunzellverteilung in PT

Im PT zeigte sich der Großteil der Immunzellverteilung dem excluded Verteilungsmuster zugehörig. Über alle Lokalisationen gemittelt machten diese mehr als die Hälfte (52,6%) aus. Die restlichen Karzinome verteilten sich dabei in etwa gleich auf die Muster cold (23,3%) und hot. (21,7%). Anders präsentierte sich die Phänotypik hinsichtlich der Immunzellverteilung in den RD der HNSCC. Hier ließ sich die Mehrheit dem cold (47,6%) oder dem excluded (42,9%) Verteilungsmuster zuordnen. Lediglich 9,5% zeigten eine hot Verteilung. Abbildung 13 stellt im Weiteren die Aufteilung der Immunzellverteilung in den PT entlang der einzelnen Lokalisationen graphisch dar und zeigt dabei keine relevanten Unterschiede unterhalb der Subgruppen.

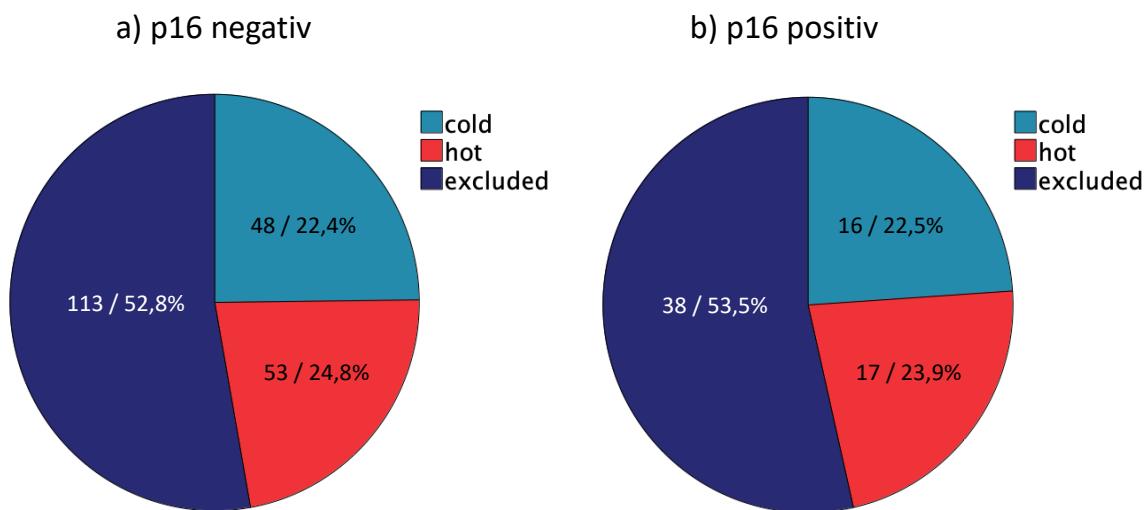
Abbildung 13: Immunzellverteilung im PT für Hypopharynx (HP), Larynx (L), Mundraum (MR) und Oropharynx (OP) jeweils für p16 positiv und negativ



3.3.2 Vergleich der Immunzellverteilung der p16 positiven und p16 negativen HNSCC

Die Verteilung der immunologisch cold, hot und excluded Karzinome präsentierte sich in etwa gleich in der Gegenüberstellung der p16 positiven und p16 negativen HNSCC. Etwas mehr als die Hälfte entfiel dabei jeweils auf die Verteilung excluded. Die Muster hot und cold zeigten sich näherungsweise in einem Viertel. Insgesamt waren in beiden Untergruppen demnach in etwa drei Viertel der Karzinome immunzellinfiltiert. Für die genaue prozentuale Verteilung vergleiche man hierzu Abbildung 14.

Abbildung 14: Tortendiagramme zur Immunzellverteilung in p16 negativen a) und p16 positiven b) HNSCC



3.3.3 Einfluss der Immunzellverteilung im PT auf das mittlere 5-Jahres

Gesamtüberleben und das mittlere krankheitsfreie 5-Jahres Überleben

Die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für das mittlere 5-Jahres Gesamtüberleben in Abbildung 15a) zeigt die Gegenüberstellung der unterschiedlichen immunologischen Verteilungsmuster der HNSCC. Karzinome, die der Immunzellverteilung cold zuzuordnen waren, zeigten jeweils im Vergleich zu den tumorinfiltrierenden Phänotypen hot (Abb. 16,

Pfad a: $p=0,041$) und excluded (Abb. 16, Pfad b: $p=0,019$) signifikant niedrigers 5-Jahres Gesamtüberleben. Abbildung 15 b) verdeutlicht dies über einen dichotomen Kurvenverlauf, in dem das Verteilungsmuster cold den beiden anderen Mustern gegenübergestellt wurde. Auch hier bestätigte der Log-Rank-Test einen signifikanten Unterschied ($p=0,012$). Die beiden immunzellinfiltrierenden Verteilungsmuster hot und excluded zeigten untereinander keinen signifikanten Unterschied. Ein signifikanter prognostischer Einfluss der Immunzellverteilung auf das Mittlere 5-Jahres Überleben wurde zudem über eine univariate Cox Regression ermittelt ($HR=0,542$; $p=0,005$). In einer anschließenden multivariaten Cox Regression konnte die Unabhängigkeit dieser prognosebestimmenden Variable im Vergleich zu anderen Prognosefaktoren herausgestellt werden. Das heißt es kam in dieser Untersuchung zu keinen Korrelationen zwischen dem Immunzellverteilungsstatus und anderen relevanten Prognosefaktoren wie UICC Status, T Stadium, Auftreten einer RD oder einer DM und dem p16 Status für HNSCC und OPSCC ($HR=0,527$; $p=0,003$; Vgl. App. 2). Es zeigte sich kein Einfluss der Immunzellverteilung auf das mittlere krankheitsfreie Überleben (DFS; Vgl. App. 3).

Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurven für mittleres 5-Jahres Gesamtüberleben für Immunzellverteilung cold, hot, excluded a) und cold versus non-cold b)

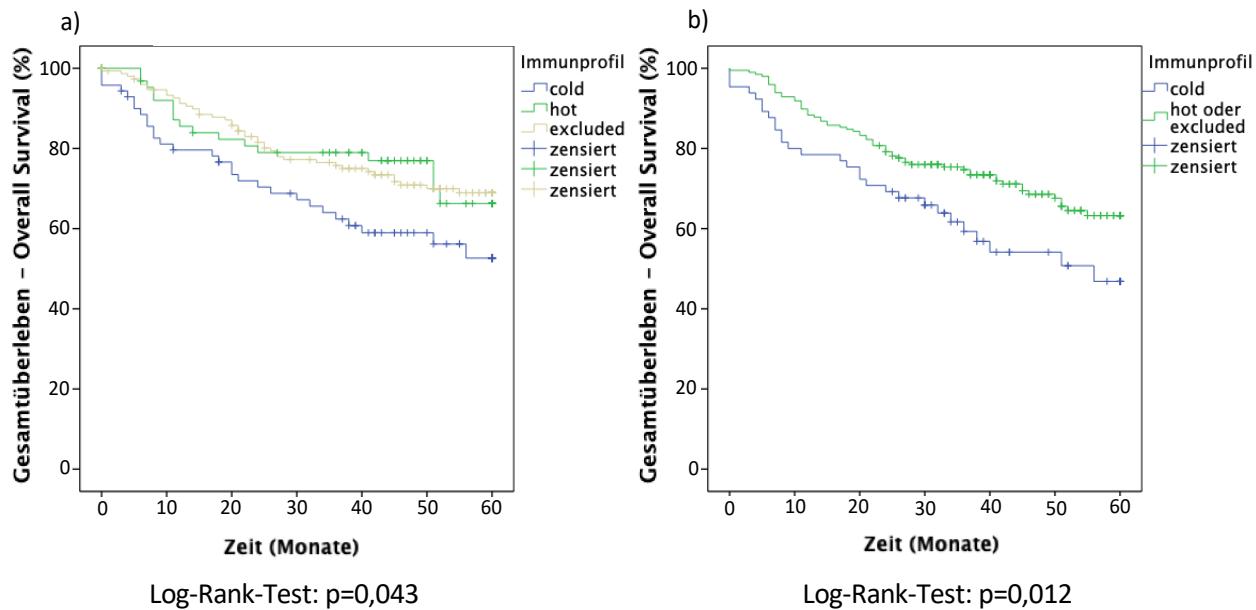
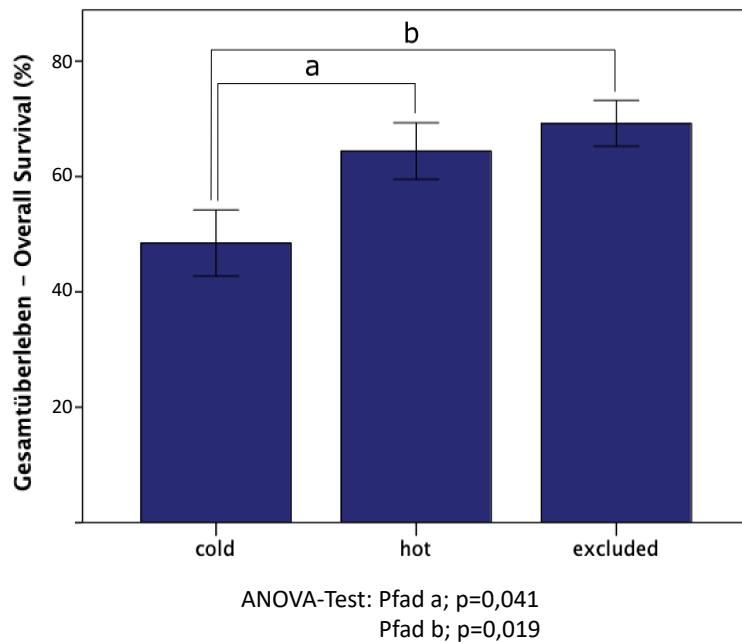


Abbildung 16: Signifikant niedrigeres 5-Jahres Gesamtüberleben für cold Immunzellverteilung gegenüber hot (Pfad a) und excluded (Pfad b)

Fehlerbalken beschreiben 95%-Konfidenzintervalle



3.3.4 Immunzellverteilung in RD

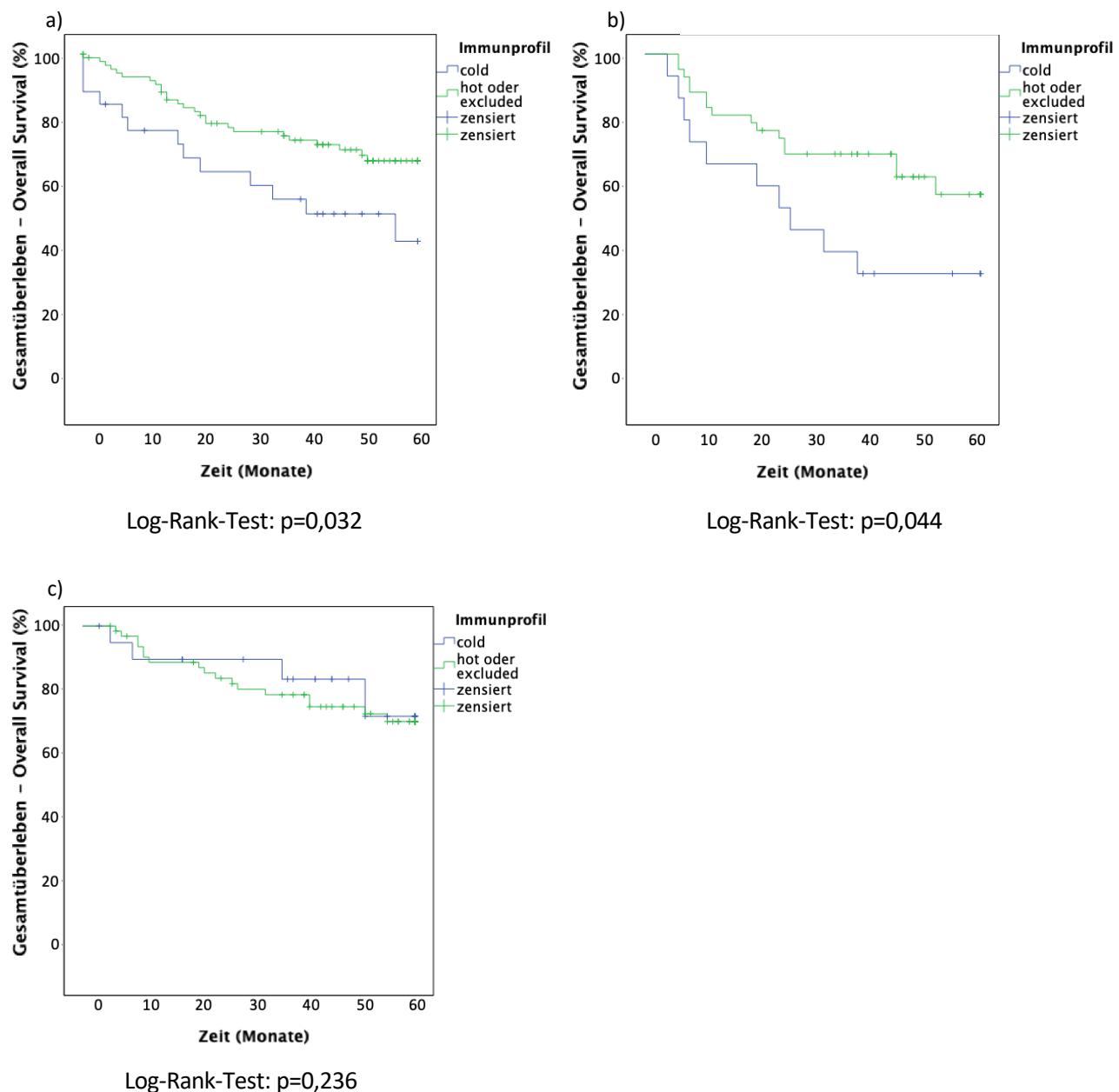
Hinsichtlich der Überlebensanalysen für die Immunzellverteilung innerhalb der RD waren keine signifikanten Einflüsse zu ermitteln. Auch im Vergleich der Verteilungsmuster zwischen PT und RD waren keine Korrelationen zu erheben.

3.3.5 Einfluss der Immunzellverteilung in Abhängigkeit unterschiedlicher Therapieregime auf das mittlere 5-Jahres Gesamtüberleben

In der Betrachtung der Überlebensanalysen für die Immunzellverteilung in Abhängigkeit unterschiedlicher Therapieregime der PT ließ sich ein signifikant ungünstigeres Gesamtüberleben für cold gegenüber tumorinfiltrierender (hot und excluded) HNSCC herausstellen, wenn diese monotherapeutisch Tumorresektion (Abb. 17 a); p=0,032) oder Tumorresektion mit kombinierter Radiochemotherapy (Abb. 17 b); p=0,044) erhielten. Kein signifikanter Unterschied im mittleren Gesamtüberleben der beiden Immunzellprofile, zeigte

sich in der Gruppe der Patienten, die eine operative Behandlung mit adjuvanter Bestrahlung ohne Chemotherapie (Abb. 17 c); $p=0,236$) erhielten.

Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven für mittleres 5-Jahres Gesamtüberleben
für die Immunzellverteilung in Abhängigkeit vom Therapieregim: OP a),
OP/Radiochemotherapie b), OP/Bestrahlung c)



4 Diskussion

4.1 Beurteilung der Methodik

Um eine angemessene Bewertung der Qualität der Studie und die Generalisierbarkeit der Studienergebnisse zu ermöglichen, wurde im Aufbau dieser Studie darauf geachtet die Ergebnisse anhand der REMARK (Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies) Kriterien zu erheben und zu präsentieren. Diese Guidelines wurden erstmalig 2005 vorgestellt und seither immer wieder angepasst. Sie dienen dabei der Förderung von Transparenz und Vergleichbarkeit von prognostischen Marker-Studien [69].

4.1.1 Kohortenaufbau

Ziel dieser Arbeit war es, eine retrospektive Gewebe Kohorte mit Patienten aufzubauen, die zwischen dem 01.01.2006 und dem 31.12.2015 an einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals Bereiches (HNSCC) erkrankten und am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck behandelt wurden. Der Endpunkt der Datenerhebung sollte dabei der 31.12.2017 sein. Die Kohorte sollte ein nützliches Werkzeug für zukünftige Gewebeanalysen und eine Grundlage für Forschungsprojekte erschaffen, die für das Screening immunhistochemischer Marker oder die Beschreibung des Gewebe Microenvironments verwendet werden könnten. Auf Grundlage der daraus gewonnenen Erkenntnisse würden sich weitere klinische oder experimentelle Forschungsprojekte ableiten und anschließen lassen, die auch Kausalzusammenhänge der pathologischen Zellforschung ermöglichten. Weiterhin sollte diese Kohorte Einblicke in lokal-epidemiologische Gegebenheiten eröffnen und eine Vergleichbarkeit mit anderen Datenbanken möglich machen.

Zunächst wurden über das klinische Abrechnungssystem des Universitätsklinikums insgesamt 1266 Fälle nach ICD-O-3, Sektion C ausgewählt und hinsichtlich Einschlusskriterien in die Kohorte untersucht. Diese Einschlusskriterien waren dabei die definitive histopathologische Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereichs und eine ausreichende Menge an archiviertem Tumorgewebe, um daraus verwertbare Akzeptorblöcke aufbauen zu können. Nach Abschluss dieser Sichtung blieben lediglich n=419 Fälle übrig, die diese Kriterien erfüllten. Bei einem Großteil der Ausschlussfälle war zu wenig Tumormasse archiviert oder bereits für andere Forschungsprojekte genutzt worden, sodass diese in der Gewebekohorte

nicht berücksichtigt werden konnten. Weiterhin wurden im Abrechnungssystem auch einige Fälle aufgeführt, bei denen lediglich der Verdacht auf das Vorliegen eines HNSCC bestand, der sich in der histopathologischen Aufarbeitung jedoch nicht bestätigte.

Während der Sammlung einer solch großen Datenmenge ergeben sich weiterhin viele Faktoren, die zur Verfälschung der Ergebnisse führen können. Dies bezieht sich vor allem auf die klinisch erhobenen Anamnesen, die abhängig vom dokumentierenden Arzt, individuellen Schwankungen und Dokumentationsfehlern unterliegen. Spezifisch in dieser Arbeit zeigten sich bei der Sammlung der klinischen Patientendaten im Besonderen Unvollständigkeiten in der Nachverfolgung der post-therapeutischen Überlebenszeiträume, da sich einige Patienten der Nachbehandlung entzogen oder in ambulanter Betreuung weiterbehandelt wurden. Diese Lücken konnten zum Teil mit nicht unerheblichem Aufwand vor der Anonymisierung der Daten unter Einhaltung der Richtlinien des Datenschutzgesetzes durch explizites Erfragen des weiteren Krankheitsverlaufs bei Anschlussbehandlungsversorgern gefüllt, jedoch nicht gänzlich komplettiert werden. So fehlen von 419 eingeschlossenen HNSCC Patienten bei 38 (9,1%) definitive Endpunkte und mussten daher bei den Überlebensanalysen zensiert werden.

Im Verlauf der Studie änderte sich zudem die UICC Klassifikation zur neuen 8. Auflage. Dies machte es notwendig, die klinisch erhobenen Daten zu reevaluieren und sämtliche PT nach der neuen 8. Auflage zu reklassifizieren.

4.1.2 Material

Das Tumorgewebe für die Erstellung der TMAs wurde aus archivierten FFPE Blöcken geborgen. Formalinfixierung eignet sich gerade für längere Aufbewahrung von biologischem Gewebe und zeichnet sich darüber hinaus durch eine gute Präservation der morphologischen Strukturen aus. Allerdings ist die Reaktivität der Antigene mit Antikörpern nach der Entparaffinierung im Gegensatz zu Gewebe, das kryofixiert wurde, herabgesetzt [70,71].

Im Rahmen der TMA Färbungen und der Aufbringung der Schnitte auf die Objektträger kam es vereinzelt zu Schäden der Tumorcores, sodass diese nicht erfasst und nicht mit in die Analysen einbezogen werden konnten. Da jedoch jeweils 3 Cores pro Patienten auf die Objektträger aufgebracht wurden, kam es nur vereinzelt dazu, dass Tumorgewebe eines Patienten gänzlich aus der Analyse ausgeschlossen werden musste.

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung ist die am weitesten verbreitete Routinefärbemethoden und bietet sich daher im Rahmen von Gewebeanalysen als Übersichtsfärbung an. Diese Übersichtsschnitte wurden ebenfalls aus den Archiven geborgen und zeichneten sich durch einfachen Gebrauch für die Bestimmung der Immunzellverteilung des TIME aus. Gerade der geringe Aufwand an zusätzlicher Aufbereitungsarbeit des Materials stellt eine kostengünstige und elegante Methode dar.

4.1.3 Färbungen

Die immunhistochemische Färbung von EVI1 war hochspezifisch und ermöglichte dadurch in der angeschlossenen quantitativen Analyse eine gute Bewertung der Expression.

Es bietet sich an, die Färbung für EVI1 in einem Durchlauf oder in kurzer zeitlicher Abfolge anzufertigen und zeitnah auszuwerten. Im ersten Anlauf der Expressionsanalyse stellte sich nämlich heraus, dass die TMAs trotz geeigneter Lagerung nach gewisser Zeit verblassten. Da der erhobene expression score u.a. auf der Färbeintensität beruht, verfälschten sich die Ergebnisse daher zu Anfang und waren nicht mehr reproduzierbar. Dies machte es notwendig die Färbung in einem Durchlauf zu wiederholen und die Erfassung der ultrahochauflösenden Scans zeitnah anzuschließen.

4.1.4 Quantitative Auswertung

Für die Quantifizierung der epidemiologischen Daten, der EVI1-Expression und der Immunzellverteilung wurden spezifische Verfahren etabliert und angewandt, um jeweils die bestmögliche Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten und werden diesbezüglich nachfolgend diskutiert.

4.1.4.1 Epidemiologische Kohorten Daten

Für die Auswertung der epidemiologischen Daten wurden Patientenakten spezifisch nach den beschriebenen klinisch-pathologischen Informationen durchsucht und diese in einer fortlaufenden Excell® Tabelle gesammelt und kodiert. Je nachdem, welches Kriterium bei den Kohortenanalysen untersucht werden sollte, wurden einzelne Spalten oder Untergruppen in das Statistikprogramm IBM® SPSS® Statics überführt und dort weiter ausgewertet. Die Vorteile einer Excelltabelle sind unter anderem die Möglichkeiten der Umformung und

Anpassung der Datensätze, um spezifische Subgruppen, zum Beispiel den Anteil der p16 positiven Oropharynxkarzinome, aus der Gesamtmasse herauszufiltern. Außerdem lassen sich damit Rechnungen, wie zum Beispiel die Erhebung der Anzahl von Monaten zwischen ED bis Rezidiv, durchführen und erhobene Daten aus Gewebeanalysen über S-Verweise den einzelnen Patienten zuordnen. Allerdings ist Microsoft® Excel® anfällig für Folgefehler und nicht dafür geeignet mit mehreren Untersuchern simultan an den gleichen Datensätzen zu arbeiten. Aus diesem Grund ist es sinnvoll für die weitere Verwendung der Kohorte eine Datenbank anzulegen, die eine höhere Datensicherheit gewährleisten und eine gleichzeitige Nutzung ermöglichen würde. Die komplette Erstellung der Tabelle erfolgte jedoch zu zweit nach dem Vier-Augen-Prinzip in aufeinanderfolgenden Sitzungen um das Auftreten von Fehlern so gering wie möglich zu halten.

4.1.4.2 Expression von EVI1

Die Quantifizierung immunhistochemischer Expressionen ist Bestandteil vieler unterschiedlicher klinischer Klassifikationssysteme und steht im Fokus pathologischer Forschung. Viele dieser Scores werden dabei manuell per so genanntem „eye-balling“ durch Pathologen am Mikroskop erhoben und auf Grundlage von Färbeintensität oder Verteilungsmuster den spezifischen Klassen zugeordnet. Diese Form der Expressionsquantifizierung unterliegt dabei jedoch immer einer gewissen Intra- und Interobserver-Variabilität und ist daher immer wieder auch Bestandteil fachlicher Diskussion.

Die Bildanalysesoftware *Tissue Studio® Definiens®* hat gezeigt, dass sie ein leistungsfähiges und präzises Werkzeug für die Quantifizierung von IHC Färbungen darstellt und nützlich für die Objektivierbarkeit der IHC Bewertungsstrategien sein kann [72]. Aus diesem Grund hat es sich angeboten die Evaluierung der Expressivität des nukleären Markers EVI1 über dieses Programm auszuwerten, um dadurch Observer-Variabilitäten zu vermeiden. Die hierfür notwendige Digitalisierung der TMAs erfolgte mit Hilfe des Ventana iScan HT Slide Scanners, der ultrahochauflösende Bilder von Gewebeschnitten erzeugen kann und ein anerkanntes High-End-Gerät darstellt.

Da im Rahmen der Fragestellung lediglich das Expressionsverhalten innerhalb karzinogener Zellen von Interesse war und die Bildanalysesoftware Tumorareale nicht von Stroma unterscheiden kann, war es notwendig so genannte „Region of interests“ (ROI) zu definieren,

die manuell in die gescannten Tumortores eingezirkelt wurden. Dies stellte sicher, dass koexprimierende Zellen außerhalb des Tumorgewebes nicht mit in die Auswertung einbezogen wurden. Nicht immer waren dabei genaue Grenzen zwischen den zum Teil versprengt verteilten Tumorzellen und dem Stroma ersichtlich, was das Zirkeln in manchen Cores erschwerte und zu einer möglichen Fehlannotation geführt haben könnte. Jedoch wurde dieser Schritt unter der Aufsicht erfahrener Pathologen durchgeführt und anschließend überprüft.

Da sich die Expression des Markers innerhalb des Tumorgewebes als heterogenes Muster abzeichnete, was auch in der EVI1 Expression im Prostatakarzinom vorbeschrieben wurde [52], sollte ein Expressionswert erhoben werden, der sowohl die durchschnittliche Expressionsintensität des Markers, als auch die intertumoröse Expressionshomogenität abbildet. In Anlehnung an den immunreaktiven Score (IRS), der in der klinischen Quantifizierung des Progesteron- und Östrogenrezeptors seine Anwendung findet [73], wurden dabei die beiden einheitslosen Werte für die Färbeintensität und den Anteil positiver Zellen miteinander multipliziert. Dies ermöglichte es anhand eines Wertes die maximale Expressivität zu erfassen und diese zu quantifizieren.

4.1.4.3 Immunzellverteilung des TIME

Die Verteilungsklassifikation der Immunzellen des TIME wurde lichtmikroskopisch durchgeführt, wie es auch in der täglichen histopathologischen Diagnostik üblich ist. Da die objektive Quantifizierung durch diese Form der Analytik, wie bereits erwähnt, anfällig für Observer-Variabilitäten ist, wurden in dieser Arbeit die HE-Übersichtsschnitte in zwei voneinander unabhängigen Auswertungen erfahrener Pathologen, bzw unter der Anleitung und Aufsicht eines Pathologen, untersucht und verglichen. Um die größtmögliche Sicherheit zu gewährleisten wurde nach einer Übereinstimmung der Einteilung von insgesamt 96% der Fälle, in den restlichen Fällen ein dritter Pathologe (Direktor des Instituts) für eine endgültige Entscheidung hinzugezogen.

4.1.4.4 Statistische Auswertung

In der vorangestellten Berechnung der minimalen Stichprobengröße, deren Variablen den allgemeinen Standards entsprachen, ließ sich die Mindestanzahl von 62 Fällen erheben, die

benötigt wurde, um einen statistisch signifikanten Effekt auch tatsächlich aufzudecken. Auf Grundlage der hohen Anzahl an eingeschlossenen Patienten (n=419) und reseziertem Tumorgewebe (PT: n=289, LM: n=192, FM: n=22, RD: n=42) standen für statistische Analysen und Korrelationen deshalb zumeist ausreichend hohe Datensätze zur Verfügung. Die niedrigere Anzahl an FM- und RD-Gewebe ist zum einen darin begründet, dass diese auch nur bei einer gewissen Zahl an Patienten auftraten und dann auch nicht immer entfernt wurden. Analysen, die mit diesem Gewebe angestellt wurden, haben somit eine höhere Wahrscheinlichkeit einem Betafehler zu unterliegen.

Je nachdem welche Subgruppierungen der Kohorte außerdem untersucht wurden, blieben zum Teil nur wenige Fälle übrig, deren Auswertung keine validen Ergebnisse gerechtfertigt hätten. So fanden zum Beispiel auf Grund zu niedriger Anzahlen an CUP (3,1%) und Mehretagenkarzinomen (3,1%) diese in den Überlebensanalysen keine Erwähnung.

4.2 Beurteilung der Ergebnisse

4.2.1 Kohorte

Die Lübecker Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomgewebekohorte besteht aus 419 Patienten und lässt sich entsprechend den Ergebnissen der Tumorepidemiologie und ihren Eigenschaften im Vergleich zu nationalen und internationalen Datensätzen als repräsentatives Kollektiv bewerten. Hierbei wurde im Vergleich mit Daten des Robert-Koch-Instituts die typische Geschlechterverteilungen mit einer männlich zu weiblich Ration von 3:1 [5] und das typische mittlere Erkrankungsalter von 62 für männliche und 63 für weibliche Betroffene erreicht [4].

In 27,7% der Fälle ließ sich ein postiver p16 Status als Surrogatmarker einer HPV Infektion über alle HNSCC gemittelt nachweisen. Dabei zeigten sich in etwa 50% der OPSCC und 17% der nicht-OPSCC p16 positiv, was sich ebenso analog zu nationalen wie internationalen epidemiologischen Daten verhält [74–77].

Hinsichtlich der Verteilung entlang der unterschiedlichen Tumorlokalisationen finden sich die meisten PT entweder im Mundraum oder im Pharynx (79%), weniger im Larynx (21%) [4,5]. Auch diese Verteilung spiegelt sich in der Lübecker HNSCC Kohorte wider.

Betrachtet man die Verteilung der UICC Stadien so fällt auf, dass diese Kohorte weniger T1 klassifizierte Fälle aufweist (22,6%), als dies in nationalen Datenbanken der Fall ist (25-44%). Dies scheint dem Umstand geschuldet zu sein, dass für den Aufbau einer Gewebekohorte auch genügend Tumormaterial vonnöten ist, um verwertbare TMA Cores zu erzeugen. T1 Tumore bieten auf Grund der kleineren Masse nicht immer genügend Material, sodass hier eine Verschiebung der UICC Klassen zu Gunsten größerer Tumore aufgetreten sein könnte. Ebenso verzerrt stellen sich die Verteilungen hinsichtlich höherklassiger UICC Stadien dar. Tumore im UICC-IV Stadium werden dabei im Vergleich bei ED in etwa zwischen 40% im Larynx und 75% im Pharynx klassifiziert [4], in dieser Studie jedoch nur 43,1% insgesamt. Dies scheint daher zu röhren, dass die Kohorte hauptsächlich auf Grundlage des verfügbar archivierten Tumorgewebes aufgebaut wurde und fortgeschrittene Tumore der UICC IV häufig nicht operativ entfernt werden, sondern eine palliative Radiochemotherapie oder „best supportive care“ erhalten.

In der Betrachtung der 5-Jahres Überlebens Analysen lässt sich im Rahmen dieser Studie bestätigen, dass die Prognose des HNSCC nach wie vor als ungünstig zu bewerten ist. Analog zu den Daten des Robert Koch Instituts überleben abhängig von der Tumorlokalisation und dem Geschlecht nur etwa die Hälfte der Betroffenen die ersten 5 Jahre nach ED (48% der männlichen und 59% der weiblichen Erkrankten für Plattenepithelkarzinome des Mundraums/Pharynx, 63% der männlichen und 64% der weiblichen Erkrankten für Plattenepithelkarzinome des Larynx) [5]. Auch in dieser Studie lassen sich ungünstige 5-Jahres Überlebensraten für Plattenepithelkarzinome des Mundraums (51,8%) und des Hypopharynx (54,8%) gegenüber denen des Oropharynx (65%) und des Larynx (67,2%) finden. Im Vergleich zur EURO-CARE 5 Study [78], in der seit vielen Jahren Überlebensdaten von Krebspatienten in ganz Europa gesammelt und verglichen werden, verhält sich das 5-Jahres Überleben über die gesamte Kohorte gemittelt (61,9%) sowohl gegenüber den europäischen als auch den deutschen Daten kongruent. Es zeigt sich also, dass die hier aufgeführten Daten nicht nur mit denen der anerkannten nationalen wie internationalen Datenbanken übereinstimmen, sondern die ungünstige Prognose des HNSCC innerhalb des Lübecker Kollektivs weiterhin zu beobachten ist. Dies liegt mutmaßlich auch darin begründet, dass die Lübecker HNSCC Gewebe Kohorte hinsichtlich der angewandten Therapieoptionen naiv gegenüber neuen Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) ist, die erst nach dem Endpunkt der Datenerhebung als zusätzliche Therapieform zugelassen wurden. Neuere Daten hierzu bestätigen, dass PD-1

Inhibitoren das Leben von Patienten mit rezidivierendem oder metastasiertem HNSCC verlängern [29,79,93], und es wird abzuwarten bleiben, inwieweit die Langzeitprognosen dadurch beeinflusst werden. Es ist jetzt aber schon zu erkennen, dass das Ansprechen von HNSCC auf die derzeitigen Immuntherapien weniger erfolgreich ist, als in anderen Tumorentitäten (Siehe 1.7 Therapieoptionen).

Anhand der Ergebnisse dieser Studie lässt sich weiterhin beobachten, dass die neuen Anpassungen der UICC Klassifikation dazu geführt haben, dass sich hinsichtlich der 5-Jahres Überlebens Analysen eine präzisere prognostische Wertigkeit der neuen 8. Klassifikation abzeichnet. Dabei beschreiben die Stadien UICC I und UICC IV deutlichere Extreme und der Verlauf der Überlebensdaten wird durch ein eher stetig abfallendes Muster gekennzeichnet. In der Reklassifizierung kam es aufgrund neuer Kriterien dabei zu einer Alternation von Fällen innerhalb der einzelnen Klassen. Vergleicht man diese, werden drei Änderungen offensichtlich: Zunächst wurde die neue T0 Klasse für CUP definiert, die vormals mit TX gekennzeichnet wurde (100% der CUP wurden reklassifiziert). Außerdem mussten in etwa einem Drittel der Fälle der initial als T2 klassifizierten Plattenepithelkarzinome im Mundraum in T3 (33,3%) und T1 (3,3%) geändert werden. Für diese Anpassung war die neubewertete Relevanz der Tiefeninfiltration des Tumorgewebes ausschlaggebend. Zuletzt mussten in allen Lokalisationen Änderungen hinsichtlich des N-Status vorgenommen werden, welches sich am Ehesten im OPSCC abzeichnete. Hier wurde fast die Hälfte der ursprünglich als N2 klassifizierten Tumore als N1 (29,8%) und N3 (15,5%) reklassifiziert. Dies beruht auf der neu eingeführten Evaluation der extrakapsulären Ausbreitung [1], die einen negativen Einfluss auf die Entwicklung von lokoregionären Rezidiven und Fernmetastasen gezeigt hat, die ihrerseits wiederum mit schlechten Prognosen assoziiert sind [80]. Da ein hinreichender Nutzen der Änderungen weiterhin diskutiert wird [81] lässt sich hier zeigen, dass diese Anpassungen einen tatsächlichen Einfluss auf die prognostische Schärfe haben und die Änderung zur 8. Edition der UICC Klassifikationen in Betrachtung der Lübecker Kohorte gerechtfertigt war.

In der Betrachtung der 5-Jahres-Überlebens Analysen der Patienten, die eine RD oder DM entwickelten wird deutlich, dass diese Einflussgrößen weiterhin als verlaufsentscheidend zu werten sind und am ehesten mit einem vorzeitigen Ableben einhergehen. Für die Patienten, die im Verlauf oder bei ED eine LM entwickelt hatten, zeigt sich in Übereinstimmung mit den widersprüchlichen Daten der Literatur kein signifikanter Einfluss auf das mittlere 5-Jahres

Überleben. Dies widerspricht dabei den Bestrebungen Lymphknoten-Verhältnisse (engl Lymph node ratio, LNR) in der klinischen Anwendung als zusätzliche prognostische Größe zu implementieren [82]. Viel wichtiger scheinen hier in Anlehnung an die UICC Klassifizierung Größe und Verteilungsmuster von LM und Faktoren wie das ECS bei LM+ zu sein.

Der positive prognostische Einfluss von p16 als Surrogatmarker der HPV-assoziierten Tumorgenese im OPSCC ließ sich auch an der Lübecker Kohorte reproduzieren, was die neue Definition unterschiedlicher Subtypen im OPSCC nach der 8. UICC Edition untermauert. Der Einfluss war auch über die Gesamtkohorte nachweisbar. Dies ist aber wahrscheinlich auf die Verzerrung durch die OPSCC zurückzuführen, da sich kein signifikanter Einfluss in der isolierten Betrachtung der Nicht-OPSCC abzeichnete.

Hinsichtlich der exogenen Risikofaktoren (Rauchen, Alkoholkonsum), die zu einer Ausbildung des klassischen HNSCC führten, hat sich analog zu den Daten der Literatur auch in der Lübecker Kohorte bestätigen lassen, dass diese mit einer schlechteren Prognose einhergehen, als es bei Patienten der Fall ist, die sich diesen Noxen nicht ausgesetzt hatten. Dies unterstreicht, warum diese Faktoren als eine der wichtigsten prognosebestimmenden Größen definiert werden und warum der Verzicht mit einem hohen prophylaktischen Nutzen einhergeht [40].

4.2.2 EVI1

Um den Nutzen der Gewebekohorte über epidemiologische Analysen hinaus darzulegen, schien das Screening des nukleären Markers EVI1 sinnvoll, da dieser bereits als wichtiger prognostischer Marker in myeloiden Neoplasien beschrieben wurde und eine Überexpression wie bereits erwähnt auch in soliden Tumoren wie Kolonkarzinomen, Lungenkarzinomen, Prostatakarzinomen und Ovarialkarzinomen mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist. Somit wird im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal ein möglicher Einfluss des Markers auch für das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs anhand der Lübecker HNSCC Kohorte untersucht und im Folgenden beschrieben.

Zunächst ist auffällig, dass im Vergleich zu den o.g. malignen Tumorerkrankungen eine Überexpression von EVI1 in HNSCC nicht mit einem verkürzten mittleren 5-Jahres Gesamtüberleben oder mittleren 5-Jahres krankheitsfreien Überleben assoziiert ist und

dadurch kein prognostischer Marker für das mittlere Überleben darstellt. Dies könnte an mehreren Faktoren liegen: Zunächst fiel die EVI1 Expression in p16 positiven gegenüber p16 negativen Tumoren in dieser Studie erhöht aus. Sowohl für HNSCC insgesamt als auch isoliert für das OPSCC stellt der p16 Status jedoch einen günstigen prognostischen Faktor dar, was die Rolle von EVI1 auf das Überleben indirekt beeinflusst haben könnte. Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die EVI1 Expression in PT, die bei ED bereits in Lymphknoten metastasiert waren erhöht ausfiel. In den meisten Tumorentitäten sind Metastasen mit schlechten Prognosen assoziiert [57]. In HNSCC hat sich dies jedoch nicht nachweisen lassen und auch innerhalb dieser Studie gab es hinsichtlich des Lymphknotenstatus keinen statistischen Zusammenhang für das Mittlere 5-Jahres Gesamtüberleben. Es konnte sogar gezeigt werden, dass p16 positive Tumore früher lymphogen metastasieren als p16 negative und dennoch eine günstigere Überlebensprognose anzeigen [83,84]. Auch dies würde erklären, warum eine höhere EVI1 Expression in anderen Tumorentitäten eine ungünstigere Prognose anzeigt und in HNSCC nicht. Unterteilte man die Kohorte anhand des p16 Status und der unterschiedlichen Lokalisationen, ließe sich eventuell ein prognostischer Einfluss für einzelne Subgruppierungen nachweisen, innerhalb dieser Studie waren diese Subgruppen jedoch zu klein, um statistisch signifikante Aussagen zu treffen und wurden demnach auch nicht mit aufgeführt.

In dieser Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass anhand einer hohen EVI Expression zum Zeitpunkt der ED eine Unterscheidung der nodal-metastasierten von den nicht-metastasierten Patienten möglich war. Aus diesem Grund könnte EVI1 als Marker für LM genutzt werden, was die Erkennung von klinisch oder radiologisch nicht erfassbaren okkulten LM vereinfachen würde. Hieraus ergäbe sich eine wichtige klinisch-therapeutische Relevanz, da sich der Umfang einer Neck dissection im Rahmen einer engeren Indikationsstellung durch die präoperative immunhistochemische Bestimmung der EVI1 Expression möglicherweise reduzieren ließe und dadurch die bereits erwähnten Komplikationen vorgebeugt und eine Übertherapie vermieden werden könnten. In anderen Tumorentitäten gibt es bereits das Prinzip der Sentinel-Lymphknotenresektion, wie etwa im Mammakarzinom [85], wodurch der Umfang einer Lymphadenektomie bestimmt werden soll. Unter Umständen wäre ein solches Vorgehen auch für das HNSCC denkbar, sicherlich wären dafür jedoch prospektive Forschungsdaten vonnöten, die eine genaue Sensitivität und Spezifität für die Erkennung von LM anhand der EVI1 Expression ermöglichen und eine Diskussion für die Verwendung in der

klinischen Diagnostik rechtfertigen würden. Dennoch stehen diese Ergebnisse analog zum Effekt der EVI1 Expression im Kolonkarzinom, in dem eine hohe EVI1 Expression für die Ausbildung von Metastasen notwendig ist. Hier konnte nämlich herausgestellt werden, dass Tumorzellen mit einem Knockdown für EVI1 in vivo nicht metastasieren konnten [57].

Interessanterweise ist EVI1 in p16 positiven HNSCC höher exprimiert als in p16 negativen HNSCC. Ob ein direkter Zusammenhang zwischen dem Surrogatmarker für HPV und der Expression des viralen Integrationsmarkers EVI1 besteht ist jedoch anhand dieser Daten nicht zu bewerten, da wie bereits erwähnt p16 positive HNSCC schneller und häufiger LM entwickeln [84]. Dadurch könnte eine höhere Expression von EVI1 in p16 positiven HNSCC auch indirekt durch eine erhöhte Metastasenrate beeinflusst sein und müsste in anschließenden Studien hinsichtlich der Kausalität weiter ergründet werden.

Zuletzt ließ sich im Vergleich der unterschiedlichen Expression für EVI1 entlang der Tumorlokalisationen bestätigen, dass HNSCC hinsichtlich der molekularen Eigenschaften keine homogene Gruppe darstellt. Analog dazu zeigte sich hier auch, dass die EVI1 Expression der LM nicht mit der Expression der zugehörigen PT korreliert und somit auch keinen direkten Klon, sondern eine weiterentwickelte Kopie der übergeordneten Tumorzellen darstellt. Dies ist im Hinblick auf neue Chemotherapie-Konzepte interessant, die primär auf die Interaktion und Blockierung spezifischer Tumorantigene (Check Point Inhibitoren) abzielen. Zukünftig wird dabei von Interesse sein, inwieweit die molekulare Plastizität unterschiedlicher Tumoren das Ansprechen von Antikörpertherapien beeinflusst und wie sich die molekulare Phänotypik des Tumorgewebes innerhalb eines Patienten entlang der Metastasierungsstufen und der Rezidive verhält, um spezifische Behandlungsstrategien auf den einzelnen Patienten maßzuschneidern. Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten wie dem malignen Melanom hat sich zum Beispiel gezeigt, dass HNSCC ein schlechteres Ansprechen auf ICI für PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab) oder für EGFR (Cetuximab) gezeigt hat [32,86]. Die Gründe dafür sind Bestandteil pathologischer Forschung und lassen nicht zuletzt vermuten, dass dies in dem unterschiedlichen molekularen Aufbau von PT, RD und den jeweiligen LM begründet liegt [28,32] und sich HNSCC hinsichtlich ihrer Lokalisation molekular voneinander unterscheiden.

4.2.3 Immunzellverteilung

Das TME ist gerade im Hinblick auf die sich etablierende Immuntherapie immer weiter in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Dabei besteht großes Interesse daran herauszufinden, welche Rolle tumorinfiltrierende Lymphozyten (engl. tumor infiltrating lymphocytes, TIL) für die Genese und Prognose der Tumorerkrankung spielen und ist demnach ein wichtiger Bestandteil pathologischer Forschung geworden. Bekannt ist, dass eine Immunzellinfiltration des Tumorgewebes (hot-Typ) in vielen Tumorentitäten mit einer günstigeren Prognose verbunden ist [87]. Weiterhin konnte bereits für das HNSCC gezeigt werden, dass CD3- und CD8-positive TIL im TME das Überleben signifikant verlängern [88]. Außerdem wurde bereits ein günstiger Einfluss von TIL auf das Überleben im Plattenepithelkarzinom des Larynx beschrieben [89]. Die Immunzellverteilung im TME lässt sich als hot, excluded und cold klassifizieren, je nachdem ob Tumorgewebe von Immunzellen infiltriert wird, diese lediglich innerhalb des Stromas auftauchen oder diese nicht im TME zu finden sind [68]. Im Rahmen dieser Studie wurde diese Klassifikation an der Lübecker HNSCC Kohorte mit Hilfe von Routine HE Schnitten der Tumorresekte erhoben, was die erste Untersuchung dieser Form für das HNSCC darstellt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Tumorgewebe, das dem cold-Typ zuzuordnen war, mit einer schlechteren Prognose hinsichtlich des 5-Jahres Gesamtüberlebens verbunden ist. Dies untermauert dabei die Ergebnisse einer kürzlich erhobenen Tumorgenomatlasm-Analyse (engl. The Cancer Genome Atlas, TCGA), in der gezeigt wurde, dass HNSCC Tumore die keine TIL aufwiesen (cold-Typ) mit einer schlechten Prognose verbunden sind [90]. Die Einteilung nach cold, hot oder excluded ist leicht zu erheben und ist schneller, günstiger und weniger aufwändig als Genom-Sequenzierung von Tumorgewebe, da hierfür lediglich Standard HE Schnitte angefertigt und unter einem Mikroskop klassifiziert werden müssen. Die hier aufgeführten Daten bestätigen, dass die UICC Klassifikation weiterhin der stärkste prognostische Marker für das HNSCC darstellt [17]. Nichtsdestotrotz könnte gerade im Hinblick auf neue Immuntherapien die Klassifizierung der Immunzellverteilung nach dem hier beschriebenen cold-/hot-/excluded-Schema die klinische Diagnostik für individualisierte Behandlungsstrategien ergänzen oder die Entscheidungsfindung für Tumore, die genau zwischen 2 UICC Stadien liegen, vereinfachen. Es erscheint demnach sinnvoll, die Etablierung dieser Methode in der klinischen Praxis zu erwägen und sollte dafür sicherlich in weiteren Studien hinsichtlich der prognostischen Wertigkeit überprüft und validiert werden.

Interessant wird in diesem Zusammenhang bleiben, inwieweit die Therapie mit ICI abhängig vom Immunzellverteilungstyp ist und ob das bereits erwähnte schlechtere Ansprechen von PD-1 Inhibitoren im Vergleich zu anderen Tumorentitäten durch das Ausbleiben von TIL (cold-Typ) zu erklären ist. Lediglich 9,5% der RD waren am Lübecker Kollektiv dem hot-Typ zuzuordnen und ganze 47,6% dem cold-Typ. Bis jetzt ist die Immuntherapie für das HNSCC jedoch nur in der Behandlung von Tumorrezidiven, nicht aber für die Behandlung von Primärtumoren zugelassen. Dies liegt nicht zuletzt auch daran, dass Zulassungsstudien vor allem an Rezidiv-Kollektiven erhoben wurden, die hinsichtlich der herkömmlichen Therapie ein Therapieversagen aufwiesen [32]. Jedoch liegt dabei der Zusammenhang zwischen einem schlechteren Ansprechen auf ICI Therapie in einem Tumor, der sich weniger oder nicht-entzündlich darstellt, nahe und sollte in weiteren Studien ergründet werden. Dafür ist es notwendig, größere Kohorten an HNSCC Rezidiv-Patienten aufzubauen und die Immunzellverteilung in Abhängigkeit von ICI Therapie zu analysieren.

Im Vergleich der unterschiedlichen herkömmlichen Therapieregime zeigte sich weiterhin, dass HNSCC, die dem cold Verteilungsmuster zugeordnet wurden, ein ungünstigeres Gesamtüberleben aufwiesen, wenn diese monotherapeutisch operativ reseziert oder operativ mit adjuvanter Radiochemotherapie versorgt wurden. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in den Überlebensanalysen für die Immunzellverteilung, wenn die Betroffenen zur operativen Therapie lediglich adjuvant bestrahlt wurden und eine zusätzliche chemotherapeutische Intervention ausblieb. Da HNSCC mit der cold Immunzellverteilung gegenüber den infiltrierenden Mustern (hot und excluded) generell eine ungünstigere Prognose aufweisen, erklärt dies wahrscheinlich den Effekt für die Subgruppe der HNSCC, die ohne Adjuvanz operativ versorgt wurden, da ansonsten gegenüber einer Tumorentfernung kein Selektionsdruck der Tumorzellen besteht. Anders ist dies jedoch in den Subgruppen, die zusätzlich bestrahlt wurden oder kombinierte Radiochemotherapie erhielten, da diese Therapien einen gewissen Selektionsdruck auf die Tumorzellen ausüben, der wiederum zur Therapieresistenz führen kann. Kriterien die für die Entscheidung der kombinierten adjuvanten Therapie sprechen sind, nebst positivem LM Status, ECS und mögliche PM [91]. Demnach deuten die hier beschriebenen Daten an, dass Betroffene mit dem cold Verteilungsmuster gegenüber den infiltrierenden Verteilungen nicht von einer adjuvant kombinierten Radiochemotherapie profitieren, da diese gegenüber diesem Regime resistenter in Erscheinung treten. Fraglich ist jedoch, ob sich dieser Effekt tatsächlich durch

die Immunzellinfiltration des Tumors erklären lässt oder ob das Unterlassen der chemotherapeutischen Therapiekomponente auf Grund von möglichen Kontraindikationen, wie akutes Nierenversagen, begünstigt wird. Um dies genauer zu untersuchen, benötigte es 2 HNSCC LM+ Arme, die anhand der oben beschriebenen Kriterien beschrieben und hinsichtlich adjuvanter Therapieregime miteinander verglichen würden. Die hier verwendeten Studiendaten lassen diese Betrachtung jedoch nicht zu, untermauern jedoch die bereits vorbeschriebene kontroverse Diskussion des Nutzens von adjuvanten Therapieregimen und weist auf die Notwendigkeit spezifischerer Faktorendiskrimination hin, wenn es um die Entscheidung der individuell bestmöglichen Therapieform geht.

HPV positive HNSCC wurden im Gegensatz zu HPV negativen bereits als eher entzündlich vorbeschrieben [88]. Dies konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden, da sich keine signifikante Korrelation der Immunzellverteilung gegenüber dem p16 Status als Surrogatmarker einer HPV Infektion abzeichnete und cold, hot und excluded Tumore in etwa den gleichen Anteilen in p16 positiven wie negativen HNSCC vertreten waren. Aus diesem Grund lässt sich durch die Beurteilung der Immunzellverteilung im TME in dieser Untersuchung kein Rückschluss auf den HPV Status ziehen. Dies könnte dabei ein Grund dafür sein, warum sich in der Subgruppenanalyse der Phase 3 Zulassungsstudie für Nivolumab (KEYNOTE-Studie) kein Unterschied in den HPV-positiven gegenüber HPV-negativen Fällen im OS abgezeichnet hat [92,93], da, wie bereits erwähnt, davon auszugehen ist, dass die Immunzellverteilung einen Einfluss auf das Ansprechen der ICI Therapie haben könnte.

Da sich die Anzahl der p16 positiven OPSCC, die für eine Auswertung nach cold/hot/excluded in Frage gekommen wären, in der Lübecker Kohorte nur limitiert widerspiegelt, sollte der Einfluss der Immunzellverteilung im HPV positiven OPSCC anhand einer größeren Kohorte gegenprüft werden, um dies auch innerhalb dieser neu eingeführten Subgruppe zu untersuchen.

4.3 Aussicht

Die Ergebnisse dieser Studie sind lediglich als Ausschnitt einer retrospektiven Betrachtung mit Hilfe einer hierzu aufgebauten Gewebekohorte zu werten und sollen primär den Nutzen von Gewebekohorten als wichtiges Werkzeug für Screening-Untersuchungen in der Forschung darlegen. Die Lübecker HNSCC Gewebekohorte wird bereits in vielen weiteren Projekten als

Grundlage von Fragestellungen und IHC-Screening-Untersuchungen genutzt und etabliert sich zunehmend als wichtiges Werkzeug in der Thesenherleitung und Planung weiterer molekularer Biomarkerforschung (siehe dafür die in App. 4 aufgeführten Folgeberöffentlichungen). Auf Grundlage der Ergebnisse für EVI1 als Marker für LM im HNSCC laufen zudem bereits Zellkulturexperimente in denen siRNA-vermittelte Knockdown Zellreihen hinsichtlich ihres molekularen Verhaltens untersucht werden, um kausale Rückschlüsse auf ein gesteigertes Metastasierungsverhalten herzuleiten und die Ergebnisse aus dieser Studie zu untermauern und kausal aufzuarbeiten. Weiterhin laufen bereits Vorbereitungen für ein prospektives Studiendesign, in dem Patienten, die trotz radiologisch erhobenem cNO Status, aber auf Grundlage eines hohen T-Stadiums, eine Neck Dissektion erhalten werden, im Vorfeld auf die EVI1 Expression im PT untersucht werden. Diese Ergebnisse sollen anschließend hinsichtlich eines möglichen prognostischen Nutzens für die Erkennung okkuler LM ausgewertet und hinsichtlich Testsicherheit und Genauigkeit überprüft werden. Aufbauend auf den hier präsentierten Ergebnissen der Immunzellverteilung im HNSCC wird bereits nach Faktoren gesucht, die diese im HNSCC beeinflusst, um somit ein genaueres Verständnis vom Einfluss des TIME im HNSCC gerade im Hinblick auf neue Immuntherapien und ihre Prognosen zu gewinnen. Diesbezüglich konnte in einem Folgeprojekt bereits gezeigt werden, dass den unterschiedlichen Verteilungsmustern spezifische Zelltypen und Biomarker zuzuordnen waren, die erste Erklärungsansätze für die unterschiedliche Immunzellverteilungen liefern könnten (siehe hierzu App. 4, 7. Publikation). Zuletzt ermöglicht diese Kohorte Einblicke in lokal-epidemiologische Gegebenheiten und untermauert dabei als immuntherapie-naives Kollektiv die Aggressivität des HNSCC und die damit einhergehende Notwendigkeit, die molekularen Eigenschaften dieser Tumorentität weiter aufzuschlüsseln.

5 Zusammenfassung der Arbeit und der Ergebnisse

5.1 Kohortendaten

- Aufbau einer repräsentativen HNSCC Gewebe-Kohorte
- Vergleich mit 5-Jahres-Überlebens Analysen aus nationalen und internationalen Datenbanken hinsichtlich Lokalisation, RD-, LM-, DM-Status
- Reklassifikation und Vergleich zwischen prognostischer Wertigkeit der ursprünglichen 7. UICC und neu eingeführten 8. UICC Klassifikation mit höherer Trennschärfe für die letztgenannte
- Signifikant längeres Mittleres 5-Jahres Überleben für p16 positive HNSCC und OPSCC
- Kein Einfluss des Gradings, Alters oder Geschlechts auf das Mittlere 5-Jahres Überleben
- Signifikanter Einfluss von exogenen Risikofaktoren (Alkoholabusus und Zigarettenrauchen) auf das Mittlere 5-Jahres Überleben

5.2 Die Rolle der EVI1 Expression

- Einführung eines Expressionswertes für EVI1, ermessan an der Intensität der Färbung und der Verteilung der exprimierenden Zellen
- Signifikant niedrigere EVI1 Expression in Plattenepithelkarzinomen des Mundraums im Vergleich zu anderen HNSCC-Lokalisationen, was heterogene molekulare Phänotypen von HNSCC vermuten lässt
- Signifikant Höhere EVI1 Expression in PT, die bei ED bereits LM ausgebildet haben und daher im Lübecker Kollektiv einen prognostischen Wert für die Ausbildung von LM mit wichtiger klinischer Relevanz darstellt
- Signifikant höhere EVI1 Expression in PT gegenüber korrespondierender LM, was untermauert, dass Tumormetastasen nicht einfachere molekulare Kopien der übergeordneten Primarien darstellen
- Signifikant höhere EVI1 Expression in p16 positiven HNSCC und Trend für höhere EVI1 Expression in p16 positiven OPSCC, was entweder indirekt durch die erhöhte Metastasierungstendenz in HPV positiven HNSCC zu erklären ist oder einen direkten Zusammenhang des viralen Integrationsmarkers vermuten lassen könnte

- Trend für EVI1 Expressionsabfall entlang des lymphogenen Metastasierungsweges
- Keine Korrelation der EVI1 Expression mit Patientenalter oder UICC-Stadium
- Im Gegensatz zu vielen anderen Tumorentitäten zeigte sich keine Korrelation der EVI1 Expression mit dem mittleren 5-Jahres Gesamtüberleben oder dem Mittleren 5-Jahres Krankheitsfreien Überleben, was auf Grund der Korrelation von EVI1 mit dem prognostisch günstigen p16 Status und dem fehlenden Einfluss der LM-Ausbildung auf die Prognose des HNSCC erklärt werden könnte

5.3 Immunzellverteilung

- Einführung des cold/hot/excluded-Schemas für die Klassifizierung der Immunzellverteilung im TME des HNSCC anhand von Standard HE Schnitten, welches einen einfachen und günstigen diagnostischen Weg darstellt.
- In etwa gleiche Verteilung der Muster entlang der Tumorlokalisationen
- In etwa gleiche Verteilung der Muster im Vergleich zwischen p16 positiven und p16 negativen HNSCC, was inkongruent zu anderen Forschungsdaten ist, jedoch das ähnliche Ansprechen von ICI Therapien im Vergleich von HPV positiven und HPV negativen HNSCC erklären könnte
- Signifikanter Unterschied im mittleren 5-Jahres Gesamtüberleben im Vergleich zwischen dem cold-Typ gegenüber dem hot- und excluded-Typ im PT, wodurch die Immunzellverteilung als prognostischer Marker für das mittlere Gesamtüberleben im HNSCC erwogen werden könnte
- Unabhängigkeit dieses Schemas gegenüber anderen prognosebestimmenden Einflussgrößen wie UICC, p16-Status, RD oder FM im Verlauf
- Geringer Anteil des hot-Typs (9,5%) und großer Anteil des cold-Typs (47,6%) im Rezidivgewebe, was im Vergleich mit anderen Tumorentitäten als Grund für ein schlechteres Ansprechen auf ICI Therapien angeführt werden könnte und im Hinblick auf eine exklusive Anwendung in der Rezidivbehandlung des HNSCC diskutiert werden sollte
- Hinweis darauf, dass das cold Verteilungsmuster gegenüber den infiltrierenden Verteilungen nicht von einer adjuvant kombinierten Radiochemotherapie profitieren könnte

- Kein Einfluss der Immunzellverteilung auf das mittlere 5-Jahres krankheitsfreie Überleben
- Kein Einfluss der Immunzellverteilung auf Überlebensanalysen im Rezidivtumorgewebe.

Literaturverzeichnis

- [1] C. Wittekind, TNM: Klassifikation maligner Tumoren, John Wiley & Sons, 2016.
- [2] K. Hunter, E. Kenneth, P. Harrison, Opinion - Profiling early head and neck cancer, *Nature Reviews. Cancer.* 5 (2005) 127–35. <https://doi.org/10.1038/nrc1549>.
- [3] C.C.R. Ragin, E. Taioli, Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis, *Int J Cancer.* 121 (2007) 1813–1820. <https://doi.org/10.1002/ijc.22851>.
- [4] A. Wienecke, K. Kraywinkel, Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland, *Onkologe.* 25 (2019) 190–200. <https://doi.org/10.1007/s00761-019-0534-0>.
- [5] R. Koch-Institut, Krebs in Deutschland für 2013/2014, Robert Koch-Institut, 2017. <https://doi.org/10.25646/3195>.
- [6] Krebs - Epidemiologie von Krebserkrankungen, (n.d.). https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Epidemiologie_node.html (accessed December 19, 2020).
- [7] A. Böcking, C. Sroll, N. Stöcklein, C. Naujoks, R. Depprich, N.R. Kübler, J. Handschel, Role of brush biopsy and DNA cytometry for prevention, diagnosis, therapy, and followup care of oral cancer, *J Oncol.* 2011 (2011) 875959. <https://doi.org/10.1155/2011/875959>.
- [8] C. Scully, J. Bagan, Oral squamous cell carcinoma overview, *Oral Oncol.* 45 (2009) 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.01.004>.
- [9] W. Böcker, H. Denk, P.U. Heitz, H. Moch, G. Höfler, H. Kreipe, Lehrbuch Pathologie, Elsevier Health Sciences, 2019.
- [10] R.P. Takes, A. Rinaldo, C.E. Silver, M. Haigentz, J.A. Woolgar, A. Triantafyllou, V. Mondin, D. Paccagnella, R. de Bree, A.R. Shaha, D.M. Hartl, A. Ferlito, Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects, *Oral Oncol.* 48 (2012) 775–779. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.03.013>.
- [11] C.R. Leemans, B.J.M. Braakhuis, R.H. Brakenhoff, The molecular biology of head and neck cancer, *Nat Rev Cancer.* 11 (2011) 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2982>.
- [12] A. Cassell, J.R. Grandis, Investigational EGFR-targeted therapies in HNSCC, *Expert Opin Investig Drugs.* 19 (2010) 709–722. <https://doi.org/10.1517/13543781003769844>.
- [13] E.S. Quabius, J. Haag, A. Kühnel, H. Henry, A.S. Hoffmann, T. Görög, J. Hedderich, M. Evert, A.G. Beule, S. Maune, R. Knecht, A. Óvári, M. Durisin, F. Hoppe, S. Tribius, C. Röcken, P. Ambrosch, M. Hoffmann, Geographical and anatomical influences on human papillomavirus prevalence diversity in head and neck squamous cell carcinoma in Germany, *Int J Oncol.* 46 (2015) 414–422. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2697>.
- [14] K. Kobayashi, K. Hisamatsu, N. Suzui, A. Hara, H. Tomita, T. Miyazaki, A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer, *J Clin Med.* 7 (2018). <https://doi.org/10.3390/jcm7090241>.
- [15] R.H. Brakenhoff, S. Wagner, J.P. Klussmann, Molecular Patterns and Biology of HPV-Associated HNSCC, Recent Results Cancer Res. 206 (2017) 37–56. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43580-0_3.
- [16] J.H. Rasmussen, C. Grønhøj, K. Håkansson, J. Friberg, E. Andersen, G. Lelkaitis, J.P. Klussmann, C. Wittekindt, S. Wagner, I.R. Vogelius, C. von Buchwald, Risk profiling based on p16 and HPV DNA more accurately predicts location of disease relapse in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma, *Ann Oncol.* 30 (2019) 629–636. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz010>.
- [17] A. Weber, A. Tannapfel, [Prognostic factors in head-neck carcinomas], *HNO.* 50 (2002)

- 35–42. <https://doi.org/10.1007/s106-002-8063-2>.
- [18] Z. Saidak, C. Lailler, F. Clatot, A. Galmiche, Perineural invasion in head and neck squamous cell carcinoma: background, mechanisms, and prognostic implications, *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 28 (2020) 90–95. <https://doi.org/10.1097/MOO.0000000000000610>.
- [19] L.B. Schmitz, C.S. Scanlon, N.J. D'Silva, Perineural Invasion in Head and Neck Cancer, *J Dent Res.* 97 (2018) 742–750. <https://doi.org/10.1177/0022034518756297>.
- [20] A. Agaimy, W. Weichert, [Grading of head and neck neoplasms], *Pathologe.* 37 (2016) 285–292. <https://doi.org/10.1007/s00292-016-0173-9>.
- [21] C. Backes, H. Bier, A. Knopf, Therapeutic implications of tumor free margins in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncotarget.* 8 (2017) 84320–84328. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21035>.
- [22] M. Hamoir, S. Schmitz, V. Gregoire, The role of neck dissection in squamous cell carcinoma of the head and neck, *Curr Treat Options Oncol.* 15 (2014) 611–624. <https://doi.org/10.1007/s11864-014-0311-7>.
- [23] D.L. Larson, R.D. Lindberg, E. Lane, H. Goepfert, Major complications of radiotherapy in cancer of the oral cavity and oropharynx. A 10 year retrospective study, *Am. J. Surg.* 146 (1983) 531–536. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(83\)90247-7](https://doi.org/10.1016/0002-9610(83)90247-7).
- [24] J.E. Meyer, C. Brocks, S. Maune, V. Strnad, J.A. Werner, B. Wollenberg, G. Kovács, [Brachytherapy for the treatment of head and neck cancer], *HNO.* 58 (2010) 947–958. <https://doi.org/10.1007/s00106-010-2161-3>.
- [25] F. Rivera, A. García-Castaño, N. Vega, M.E. Vega-Villegas, L. Gutiérrez-Sanz, Cetuximab in metastatic or recurrent head and neck cancer: the EXTREME trial, *Expert Rev Anticancer Ther.* 9 (2009) 1421–1428. <https://doi.org/10.1586/era.09.113>.
- [26] N. Zhang, K. Erjala, J. Kulmala, X. Qiu, M. Sundvall, K. Elenius, R. Grénman, Concurrent cetuximab, cisplatin, and radiation for squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro, *Radiother Oncol.* 92 (2009) 388–392. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.04.019>.
- [27] M. Taberna, M. Oliva, R. Mesía, Cetuximab-Containing Combinations in Locally Advanced and Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *Front Oncol.* 9 (2019). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00383>.
- [28] M.D. Forster, M.-J. Devlin, Immune Checkpoint Inhibition in Head and Neck Cancer, *Front Oncol.* 8 (2018) 310. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00310>.
- [29] E.E.W. Cohen, D. Soulières, C. Le Tourneau, J. Dinis, L. Licitra, M.-J. Ahn, A. Soria, J.-P. Machiels, N. Mach, R. Mehra, B. Burtness, P. Zhang, J. Cheng, R.F. Swaby, K.J. Harrington, KEYNOTE-040 Investigators, Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study, *Lancet.* 393 (2019) 156–167. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31999-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31999-8).
- [30] T.Y. Seiwert, B. Burtness, R. Mehra, J. Weiss, R. Berger, J.P. Eder, K. Heath, T. McClanahan, J. Lunceford, C. Gause, J.D. Cheng, L.Q. Chow, Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial, *Lancet Oncol.* 17 (2016) 956–965. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30066-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30066-3).
- [31] J. Schachter, A. Ribas, G.V. Long, A. Arance, J.-J. Grob, L. Mortier, A. Daud, M.S. Carlino, C. McNeil, M. Lotem, J. Larkin, P. Lorigan, B. Neyns, C. Blank, T.M. Petrella, O. Hamid, H. Zhou, S. Ebbinghaus, N. Ibrahim, C. Robert, Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-

- label phase 3 study (KEYNOTE-006), Lancet. 390 (2017) 1853–1862. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31601-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31601-X).
- [32] S.I. Pai, S. Faivre, L. Licitira, J.-P. Machiels, J.B. Vermorken, P. Bruzzi, V. Gruenwald, R.E. Giglio, C.R. Leemans, T.Y. Seiwert, D. Soulieres, Comparative analysis of the phase III clinical trials of anti-PD1 monotherapy in head and neck squamous cell carcinoma patients (CheckMate 141 and KEYNOTE 040), *J Immunother Cancer.* 7 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0578-0>.
- [33] P.M. Stell, N.S. Rawson, Adjuvant chemotherapy in head and neck cancer, *Br. J. Cancer.* 61 (1990) 779–787. <https://doi.org/10.1038/bjc.1990.175>.
- [34] D. Murdoch, Standard, and novel cytotoxic and molecular-targeted, therapies for HNSCC: an evidence-based review, *Curr Opin Oncol.* 19 (2007) 216–221. <https://doi.org/10.1097/01.cco.0000264952.98166.99>.
- [35] D.J. Sher, J. Yan, A. Day, B.D. Sumer, N.-L. Pham, S. Khan, H. Zhu, Comparative effectiveness of primary radiotherapy versus surgery in elderly patients with locally advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma, *Oral Oncol.* 88 (2019) 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.11.004>.
- [36] M.B. Amin, F.L. Greene, S.B. Edge, C.C. Compton, J.E. Gershenwald, R.K. Brookland, L. Meyer, D.M. Gress, D.R. Byrd, D.P. Winchester, The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging, *CA Cancer J Clin.* 67 (2017) 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>.
- [37] T.J. Ervin, J.R. Clark, R.R. Weichselbaum, B.G. Fallon, D. Miller, R.L. Fabian, M.R. Posner, C.M. Norris, S.A. Tuttle, D.A. Schoenfeld, An analysis of induction and adjuvant chemotherapy in the multidisciplinary treatment of squamous-cell carcinoma of the head and neck, *J. Clin. Oncol.* 5 (1987) 10–20. <https://doi.org/10.1200/JCO.1987.5.1.10>.
- [38] W.M. Lydiatt, S.G. Patel, B. O’Sullivan, M.S. Brandwein, J.A. Ridge, J.C. Migliacci, A.M. Loomis, J.P. Shah, Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual, *CA Cancer J Clin.* 67 (2017) 122–137. <https://doi.org/10.3322/caac.21389>.
- [39] J. de Juan, J. García, M. López, C. Orús, E. Esteller, M. Quer, X. León, Inclusion of extracapsular spread in the pTNM classification system: a proposal for patients with head and neck carcinoma, *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 139 (2013) 483–488. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2013.2666>.
- [40] P. Hermanek, M.K. Gospodarowicz, D.E. Henson, R.V.P. Hutter, L.H. Sabin, Prognostic Factors in Cancer, Springer Science & Business Media, 2012.
- [41] M.H. Seegenschmiedt, Nebenwirkungen in der Onkologie: Internationale Systematik und Dokumentation, Springer-Verlag, 2013.
- [42] J.-H. Chang, C.-C. Wu, K.S.-P. Yuan, A.T.H. Wu, S.-Y. Wu, Locoregionally recurrent head and neck squamous cell carcinoma: incidence, survival, prognostic factors, and treatment outcomes, *Oncotarget.* 8 (2017) 55600–55612. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16340>.
- [43] E.C. Paver, A.M. Currie, R. Gupta, J.E. Dahlstrom, Human papilloma virus related squamous cell carcinomas of the head and neck: diagnosis, clinical implications and detection of HPV, *Pathology.* 52 (2020) 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.10.008>.
- [44] M.L. Mucenski, B.A. Taylor, J.N. Ihle, J.W. Hartley, H.C. Morse, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, Identification of a common ecotropic viral integration site, Evi-1, in the DNA

- of AKXD murine myeloid tumors., *Mol Cell Biol.* 8 (1988) 301–308.
- [45] K. Morishita, E. Parganas, E.C. Douglass, J.N. Ihle, Unique expression of the human Evi-1 gene in an endometrial carcinoma cell line: sequence of cDNAs and structure of alternatively spliced transcripts, *Oncogene.* 5 (1990) 963–971.
- [46] K. Morishita, K. Suzukawa, T. Taki, J.N. Ihle, J. Yokota, EVI-1 zinc finger protein works as a transcriptional activator via binding to a consensus sequence of GACAAGATAAGATAAN1-28 CTCATCTTC, *Oncogene.* 10 (1995) 1961–1967.
- [47] S. Arai, A. Yoshimi, M. Shimabe, M. Ichikawa, M. Nakagawa, Y. Imai, S. Goyama, M. Kurokawa, Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncproteins in hematopoietic stem cells, *Blood.* 117 (2011) 6304–6314. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-234310>.
- [48] K. Kataoka, M. Kurokawa, Ecotropic viral integration site 1, stem cell self-renewal and leukemogenesis, *Cancer Sci.* 103 (2012) 1371–1377. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02303.x>.
- [49] M. Konantz, M.C. André, M. Ebinger, M. Grauer, H. Wang, S. Grzywna, O.C. Rothfuss, S. Lehle, O.S. Kustikova, H.R. Salih, R. Handgretinger, F. Fend, C. Baum, L. Kanz, L. Quintanilla-Martinez, K. Schulze-Osthoff, F. Essmann, C. Lengerke, EVI-1 modulates leukemogenic potential and apoptosis sensitivity in human acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia.* 27 (2013) 56–65. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.211>.
- [50] T. Sato, S. Goyama, K. Kataoka, R. Nasu, T. Tsuruta-Kishino, Y. Kagoya, A. Nukina, K. Kumagai, N. Kubota, M. Nakagawa, S. Arai, A. Yoshimi, H. Honda, T. Kadowaki, M. Kurokawa, Evi1 defines leukemia-initiating capacity and tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia, *Oncogene.* 33 (2014) 5028–5038. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.108>.
- [51] G. Heller, A. Rommer, K. Steinleitner, J. Etzler, H. Hackl, P. Heffeter, E. Tomasich, M. Filipits, B. Steinmetz, T. Topakian, S. Klingenbrunner, B. Ziegler, A. Spittler, S. Zöchbauer-Müller, W. Berger, R. Wieser, EVI1 promotes tumor growth via transcriptional repression of MS4A3, *J Hematol Oncol.* 8 (2015) 28. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0124-6>.
- [52] A. Queisser, S. Hagedorn, H. Wang, T. Schaefer, M. Konantz, S. Alavi, M. Deng, W. Vogel, A. von Mässenhausen, G. Kristiansen, S. Duensing, J. Kirfel, C. Lengerke, S. Perner, Ecotropic viral integration site 1, a novel oncogene in prostate cancer, *Oncogene.* 36 (2017) 1573–1584. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.325>.
- [53] A.A. Jazaeri, J.S. Ferriss, J.L. Bryant, M.S. Dalton, A. Dutta, Evaluation of EVI1 and EVI1s (Delta324) as potential therapeutic targets in ovarian cancer, *Gynecol Oncol.* 118 (2010) 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.04.007>.
- [54] X. Xu, S. Liu, X. Ji, Overexpression of ecotropic viral integration site-1 is a prognostic factor of lung squamous cell cancer, *Onco Targets Ther.* 10 (2017) 2739–2744. <https://doi.org/10.2147/OTT.S132410>.
- [55] X. Deng, Y. Cao, Y. Liu, F. Li, K. Sambandam, S. Rajaraman, A.S. Perkins, A.P. Fields, M.R. Hellmich, C.M. Townsend, E.A. Thompson, T.C. Ko, Overexpression of Evi-1 oncprotein represses TGF-β signaling in colorectal cancer, *Mol Carcinog.* 52 (2013) 255–264. <https://doi.org/10.1002/mc.21852>.
- [56] H. Wang, T. Schaefer, M. Konantz, M. Braun, Z. Varga, A.M. Paczulla, S. Reich, F. Jacob, S. Perner, H. Moch, T.N. Fehm, L. Kanz, K. Schulze-Osthoff, C. Lengerke, Prominent Oncogenic Roles of EVI1 in Breast Carcinoma, *Cancer Res.* 77 (2017) 2148–2160. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0593>.
- [57] K.B. Nayak, I.S. Sajitha, T.R.S. Kumar, S. Chakraborty, Ecotropic viral integration site 1

- promotes metastasis independent of epithelial mesenchymal transition in colon cancer cells, *Cell Death Dis.* 9 (2018) 18. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0036-1>.
- [58] M. Suarez-Carmona, J. Lesage, D. Cataldo, C. Gilles, EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression, *Mol Oncol.* 11 (2017) 805–823. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12095>.
- [59] X. Lei, Y. Lei, J.-K. Li, W.-X. Du, R.-G. Li, J. Yang, J. Li, F. Li, H.-B. Tan, Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy, *Cancer Lett.* 470 (2020) 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.009>.
- [60] A. Amedei, C. Della Bella, E. Silvestri, D. Prisco, M.M. D'Ellos, T cells in gastric cancer: friends or foes, *Clin Dev Immunol.* 2012 (2012) 690571. <https://doi.org/10.1155/2012/690571>.
- [61] R. Matkowski, I. Gisterek, A. Halon, A. Lacko, K. Szewczyk, U. Staszek, M. Pudelko, B. Szynglarewicz, J. Szelachowska, A. Zolnierek, J. Kornafel, The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer, *Anticancer Res.* 29 (2009) 2445–2451.
- [62] O. Nakano, M. Sato, Y. Naito, K. Suzuki, S. Orikasa, M. Aizawa, Y. Suzuki, I. Shintaku, H. Nagura, H. Ohtani, Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity, *Cancer Res.* 61 (2001) 5132–5136.
- [63] J. Galon, A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pagès, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoué, P. Bruneval, P.-H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.-H. Fridman, F. Pagès, Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome, *Science.* 313 (2006) 1960–1964. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>.
- [64] A. Schietinger, M. Philip, R.B. Liu, K. Schreiber, H. Schreiber, Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4+ and CD8+ T cells during the effector phase, *J Exp Med.* 207 (2010) 2469–2477. <https://doi.org/10.1084/jem.20092450>.
- [65] K. Schneider, E. Marbaix, C. Bouzin, M. Hamoir, P. Mahy, V. Bol, V. Grégoire, Immune cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma and patient outcome: a retrospective study, *Acta Oncol.* 57 (2018) 1165–1172. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1445287>.
- [66] Deklaration_von_Helsinki_2013_20190905.pdf, (n.d.).
https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/International/Deklaration_von_Helsinki_2013_20190905.pdf (accessed December 22, 2020).
- [67] J.A. Ramos-Vara, Principles and Methods of Immunohistochemistry, *Methods Mol Biol.* 1641 (2017) 115–128. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_5.
- [68] J.N. Kather, M. Suarez-Carmona, P. Charoentong, C.-A. Weis, D. Hirsch, P. Bankhead, M. Horning, D. Ferber, I. Kel, E. Herpel, S. Schott, I. Zörnig, J. Utikal, A. Marx, T. Gaiser, H. Brenner, J. Chang-Claude, M. Hoffmeister, D. Jäger, N. Halama, Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors, *eLife.* 7 (n.d.). <https://doi.org/10.7554/eLife.36967>.
- [69] L.M. McShane, for the S.S. of the N.-E.W.G. on C. Diagnostics, D.G. Altman, for the S.S. of the N.-E.W.G. on C. Diagnostics, W. Sauerbrei, for the S.S. of the N.-E.W.G. on C. Diagnostics, S.E. Taube, for the S.S. of the N.-E.W.G. on C. Diagnostics, M. Gion, for the S.S. of the N.-E.W.G. on C. Diagnostics, G.M. Clark, for the S.S. of the N.-E.W.G. on C. Diagnostics, Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK), *J Natl Cancer Inst.* 97 (2005) 1180–1184.

- [https://doi.org/10.1093/jnci/dji237.](https://doi.org/10.1093/jnci/dji237)
- [70] P.K. Nakane, G.B. Pierce, Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens, *J Histochem Cytochem.* 14 (1966) 929–931. <https://doi.org/10.1177/14.12.929>.
- [71] T.W. Jacobs, J.E. Prioleau, I.E. Stillman, S.J. Schnitt, Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer, *J Natl Cancer Inst.* 88 (1996) 1054–1059. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.15.1054>.
- [72] M. Braun, R. Kirsten, N.J. Rupp, H. Moch, F. Fend, N. Wernert, G. Kristiansen, S. Perner, Quantification of protein expression in cells and cellular subcompartments on immunohistochemical sections using a computer supported image analysis system, *Histol Histopathol.* 28 (2013) 605–610. <https://doi.org/10.14670/HH-28.605>.
- [73] L. Thomas, *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*, TH-Books-Verlag-Ges., 2008.
- [74] I. Tinhofer, K. Jöhrens, U. Keilholz, A. Kaufmann, A. Lehmann, W. Weichert, A. Stenzinger, C. Stromberger, K. Klinghammer, E.-T. Becker, S. Dommerich, K. Stölzel, V.M. Hofmann, B. Hildebrandt, L. Moser, J. Ervens, A. Böttcher, A. Albers, R. Stabenow, A. Reinecke, V. Budach, B. Hoffmeister, J.D. Raguse, Contribution of human papilloma virus to the incidence of squamous cell carcinoma of the head and neck in a European population with high smoking prevalence, *Eur J Cancer.* 51 (2015) 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.12.018>.
- [75] E.S. Quabius, J. Haag, A. Kühnel, H. Henry, A.S. Hoffmann, T. Görögh, J. Hedderich, M. Evert, A.G. Beule, S. Maune, R. Knecht, A. Óvári, M. Durisin, F. Hoppe, S. Tribius, C. Röcken, P. Ambrosch, M. Hoffmann, Geographical and anatomical influences on human papillomavirus prevalence diversity in head and neck squamous cell carcinoma in Germany, *Int J Oncol.* 46 (2015) 414–422. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2697>.
- [76] A.R. Kreimer, G.M. Clifford, P. Boyle, S. Franceschi, Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14 (2005) 467–475. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551>.
- [77] H. Mehanna, T. Beech, T. Nicholson, I. El-Hariry, C. McConkey, V. Paleri, S. Roberts, Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region, *Head Neck.* 35 (2013) 747–755. <https://doi.org/10.1002/hed.22015>.
- [78] Survival of Cancer Patients in Europe The EUROCARE-5 Study, (n.d.). <https://w3.iss.it/site/EU5Results/> (accessed December 13, 2020).
- [79] J.D. Cramer, B. Burtness, R.L. Ferris, Immunotherapy for head and neck cancer: Recent advances and future directions, *Oral Oncol.* 99 (2019) 104460. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104460>.
- [80] M. Mermod, G. Tolstonog, C. Simon, Y. Monnier, Extracapsular spread in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis, *Oral Oncol.* 62 (2016) 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.10.003>.
- [81] S.H. Huang, B. O'Sullivan, Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer, *Curr Treat Options Oncol.* 18 (2017) 40. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0484-y>.
- [82] Y.P. Talmi, R.P. Takes, E.E. Alon, I.J. Nixon, F. López, R. de Bree, J.P. Rodrigo, A.R. Shah, G.B. Halmos, A. Rinaldo, A. Ferlito, Prognostic value of lymph node ratio in head and neck squamous cell carcinoma, *Head Neck.* 40 (2018) 1082–1090. <https://doi.org/10.1002/hed.25080>.
- [83] W.M. Lydiatt, S.G. Patel, B. O'Sullivan, M.S. Brandwein, J.A. Ridge, J.C. Migliacci, A.M.

- Loomis, J.P. Shah, Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual, CA Cancer J Clin. 67 (2017) 122–137. <https://doi.org/10.3322/caac.21389>.
- [84] M. Hufbauer, M. Maltseva, J. Meinrath, A. Lechner, D. Beutner, C.U. Huebbers, B. Akgül, HPV16 increases the number of migratory cancer stem cells and modulates their miRNA expression profile in oropharyngeal cancer, Int. J. Cancer. 143 (2018) 1426–1439. <https://doi.org/10.1002/ijc.31538>.
- [85] A.E. Giuliano, K.V. Ballman, L. McCall, P.D. Beitsch, M.B. Brennan, P.R. Kelemen, D.W. Ollila, N.M. Hansen, P.W. Whitworth, P.W. Blumencranz, A.M. Leitch, S. Saha, K.K. Hunt, M. Morrow, Effect of Axillary Dissection vs No Axillary Dissection on 10-Year Overall Survival Among Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis: The ACOSOG Z0011 (Alliance) Randomized Clinical Trial, JAMA. 318 (2017) 918–926. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.11470>.
- [86] K. Wistuba-Hamprecht, G. Pawelec, KEYNOTE-006: a success in melanoma, but a long way to go, Lancet. 390 (2017) 1816–1817. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31816-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31816-0).
- [87] W. Xu, V.G. Atkinson, A.M. Menzies, Intratumoural immunotherapies in oncology, Eur J Cancer. 127 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.12.007>.
- [88] E.J. de Ruiter, M.L. Ooft, L.A. Devriese, S.M. Willems, The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis, Oncoimmunology. 6 (2017) e1356148. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1356148>.
- [89] Evaluation of PD-L1 Expression and Associated Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma - PubMed, (n.d.). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26408403/> (accessed December 16, 2020).
- [90] B. Li, Y. Cui, D.K. Nambiar, J.B. Sunwoo, R. Li, The Immune Subtypes and Landscape of Squamous Cell Carcinoma, Clin Cancer Res. 25 (2019) 3528–3537. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4085>.
- [91] G.S. Ajmani, C.C. Nocon, C.-H. Wang, M.K. Bhayani, Assessment of adjuvant therapy in resected head and neck cancer with high-risk features, Oral Oncol. 74 (2017) 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.09.005>.
- [92] E. Larkins, G.M. Blumenthal, W. Yuan, K. He, R. Sridhara, S. Subramaniam, H. Zhao, C. Liu, J. Yu, K.B. Goldberg, A.E. McKee, P. Keegan, R. Pazdur, FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with Disease Progression on or After Platinum-Containing Chemotherapy, Oncologist. 22 (2017) 873–878. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0496>.
- [93] R.L. Ferris, G. Blumenschein, J. Fayette, J. Guigay, A.D. Colevas, L. Licitra, K. Harrington, S. Kasper, E.E. Vokes, C. Even, F. Worden, N.F. Saba, L.C. Iglesias Docampo, R. Haddad, T. Rordorf, N. Kiyota, M. Tahara, M. Monga, M. Lynch, W.J. Geese, J. Kopit, J.W. Shaw, M.L. Gillison, Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck, N Engl J Med. 375 (2016) 1856–1867. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602252>.

Appendix

Appendix 1: Univariate Cox Regression möglicher prognosebestimmender Variablen

*statistisch signifikanter Wert

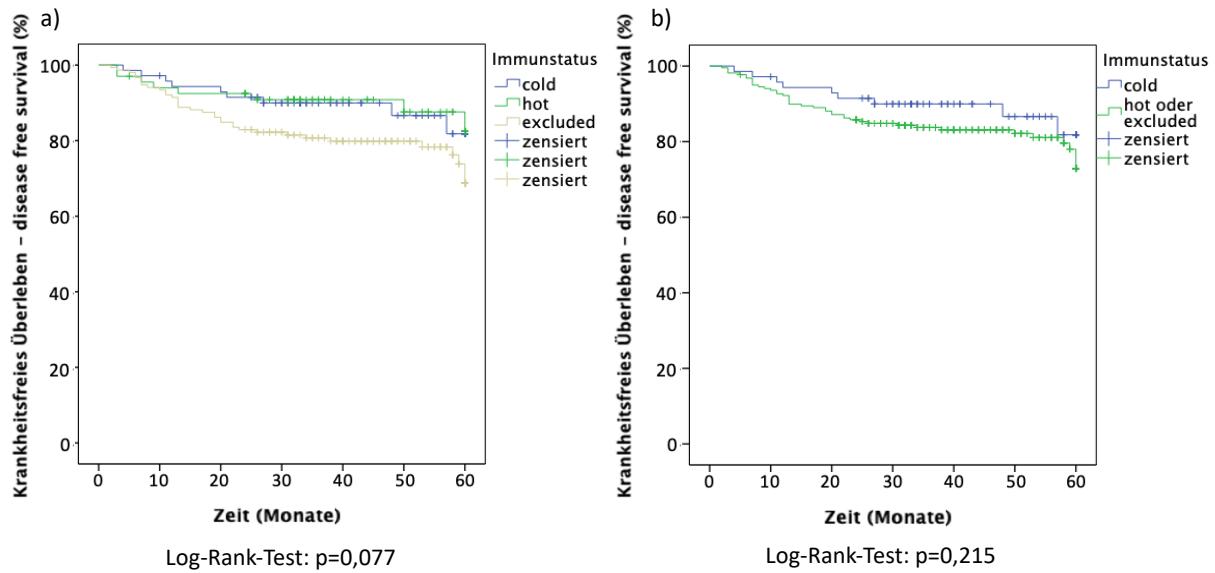
Variable	p-Wert	Hazard Ratio (HR)	95% Konfidenzintervall
Alter	0,165	1,325	0,891-1,966
Geschlecht	0,556	1,153	0,718-1,851
Immunzellverteilung	0,005*	0,542	0,360-0,832
UICC Stadium 8. Ed.	<0,001*	1,543	1,335-1,785
• T Stadium isoliert	<0,001*	1,927	1,303-2,849
UICC Stadium 7. Ed.	<0,001*	1,370	1,172-1,601
Grading	0,354	1,239	0,788-1,949
p16 Expression			
• HNSCC Gesamt	0,001*	0,516	0,347-0,767
• OPSCC	0,004*	0,485	0,248-0,763
Auftreten eines Rezidivs	0,042*	1,224	1,098-1,472
Auftreten einer LM	0,321	1,124	0,892-1,417
Auftreten einer DM	0,001*	1,445	1,156-1,808

Appendix 2: Multivariate Cox Regression der signifikant prognostischen Variablen

*statistisch signifikanter Wert

Variable	p-Wert	Hazard Ratio (HR)	95% Konfidenzintervall
Immunzellverteilung	0,003*	0,527	0,346-0,804
UICC Stadium	0,176	1,497	0,834-2,689
• T Stadium isoliert	0,177	1,446	0,847-2,467
p16 Expression			
• HNSCC Gesamt	0,001*	0,353	0,190-0,657
• OPSCC	0,002*	0,315	0,148-0,563
Auftreten eines Rezidivs	0,467	1,638	0,765-1,978
Auftreten einer DM	0,087	1,4635	0,901-1,843

Appendix 3: Kaplan-Meier-Kurven für mittleres 5-Jahres-krankheitsfreies Überleben für Immunzellverteilung cold, hot, excluded a) und cold versus non-cold b)



Appendix 4: Publikationen auf Grundlage der Lübecker HNSCC Gewebe-Kohorte

1. C. Idel, J. Ribbat-Idel, **P. Kuppler**, R. Krupar, A. Offermann, W. Vogel, D. Rades, J. Kirfel, B. Wollenberg, S. Perner, *EVI1 as a Marker for Lymph Node Metastasis in HNSCC*, International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 854. 21 (2020) 854.
2. J. Ribbat-Idel, S. Perner, **P. Kuppler**, L. Klapper, R. Krupar, C. Watermann, F.-O. Paulsen, A. Offermann, K.-L. Bruchhage, B. Wollenberg, C. Idel, *Immunologic “Cold” Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck are Associated with an Unfavorable Prognosis*, Frontiers in Medicine Pathology 2021.
3. L. Klapper, J. Ribbat-Idel, **P. Kuppler**, F.-O. Paulsen, K.-L. Bruchhage, D. Rades, A. Offermann, J. Kirfel, B. Wollenberg, C. Idel, S. Perner, *NR2F6 as a Prognostic Biomarker in HNSCC*, International Journal of Molecular Sciences. 21 (2020) 5527.
4. F.-O. Paulsen, C. Idel, J. Ribbat-Idel, **P. Kuppler**, L. Klapper, D. Rades, K.-L. Bruchhage, B. Wollenberg, J. Brägelmann, S. Perner, A. Offermann, *CDK19 as a Potential HPV-Independent Biomarker for Recurrent Disease in HNSCC*, International Journal of Molecular Sciences. 21 (2020) 5508.
5. C. Watermann, H. Pasternack, C. Idel, J. Ribbat-Idel, J. Brägelmann, **P. Kuppler**, A. Offermann, D. Jonigk, M.P. Kühnel, A. Schröck, E. Dreyer, C. Rosero, J. Nathansen, A. Dubrovska, L. Tharun, J. Kirfel, B. Wollenberg, S. Perner, R. Krupar, *Recurrent HNSCC*

Harbor an Immunosuppressive Tumor Immune Microenvironment Suggesting Successful Tumor Immune Evasion, Clin Cancer Res. (2021).

6. J. Ribbat-Idel, F. Dressler, C. Idel, R. Krupar, C. Watermann, F.O. Paulsen, **P. Kuppler**, L. Klapper, A. Offermann, B. Wollenberg, D. Rades, S. Laban, M. Reischl, K.L. Brueghage, S. Perner, *Performance of Different Diagnostic PD-L1 Clones in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, unpublished Data, Manuscript Submitted. (2021).
7. C. Idel, J. Ribbat-Idel, L. Klapper, R. Krupar, K.L. Brueghage, E. Dreyer, D. Rades, C. Polasky, A. Offermann, J. Kirfel, S. Perner, B. Wollenberg, *Spatial distribution of immune cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas*, unpublished Data, Manuscript Submitted. (2021)

Appendix 5: Ethikvotum



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Idel
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
im Hause

per Fax vorab: 500-42014

nachrichtlich:

Frau Prof. Dr. Wollenberg
Direktorin der Klinik für HNO

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 16-277

Datum: 08. November 2016

Sitzung der Ethik-Kommission am 03. November 2016

Antragsteller: Herr Dr. Idel

Titel: Identifizierung und Charakterisierung von tumorspezifischen und tumorassoziierten Mutationen/Regulationsanomalien von Karzinomen der Luft- und Speisewege sowie deren Vorläuferläsionen zur Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapieansätze. Retrospektiver Teil

Sehr geehrter Herr Dr. Idel,
der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach der Berücksichtigung folgender **Hinweise** keine Bedenken: Im Studienprotokoll ist der Zeitraum festzulegen, aus dem die „historischen“ Proben stammen und ihre Anzahl ist zu konkretisieren. Der Anonymisierungsprozess ist genauer darzustellen. Eine geschlechterdifferente Auswertung sollte erfolgen.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.
Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.
Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter www.drks.de). Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

■ Herr Prof. Dr. Katalinic (Soz.med. u. Epidemiologie, Vorsitzender)
Hr. Prof. Dr. Gieseler (Medizinische Klinik I, Stellv. Vorsitzender)
Hr. PD Dr. Bausch (Chirurgie)
Hr. Prof. Dr. Borck (Medizingeschichte u. Wissenschaftsforschung)
■ Fr. Farries (Amtsgericht Eutin)
■ Fr. PD Dr. Jauch-Chara (Psychiatrie)
Hr. PD Dr. Lauten (Kinder- u. Jugendmedizin)

Frau Martini (Caritas)
■ Hr. Prof. Dr. Moser (Neurologie)
■ Hr. Prof. Dr. Raasch (Pharmakologie)
Hr. Prof. Dr. Rehmann-Sutter (MGWF)
Hr. Schneider (Landgericht Lübeck)
■ Fr. Prof. em. Dr. Schrader (Plastische Chirurgie)
■ Hr. Dr. Vonthein (Med. Biometrie u. Statistik)
Fr. Prof. Dr. Zühlke (Humangenetik)

Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die zu der Entstehung und dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dabei danke ich in besonderem Maße Prof. Dr. med. Sven Perner für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine Unterstützung und sein Mentoring, das weit über den Inhalt dieser Arbeit hinaus ging und mein weiteres medizinisches Schaffen maßgeblich beeinflussen wird.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Dr. med. Julika Ribbat-Idel und Dr. med. Christian Idel, die mich während den dunklen Stunden im Institut und im Labor mit ihrem Fachwissen, Ideen und Anregungen immer wieder motiviert haben und bei denen ich auch außerhalb der Klinik immer wieder auf offene Ohren stoßen durfte.

Ich danke Dr. med. Anne Offermann und Dr. med. Rosemarie Krupar für ihre Unterstützung, ihre Einführung und ihren Rat, die in unterschiedlichen Phasen dieser Arbeit Gold wert waren.

Auch möchte ich mich bei dem gesamten Forschungsteam des PernerLabs, samt aller medizinisch-technischer Assistentinnen und Assistenten, für eine freundliche Aufnahme und eine interessante Zeit in und um die wöchentlichen Labmeetings bedanken. Wenzel Vogel danke ich für die reibungslose Unterstützung im Ablauf der TMA-Färbungen, Eva Dreyer für die Hilfe mit den Färbeprotokollen. Luise Klapper danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meinem Großvater Wilfried Schomberg und meinem Vater Joachim Kuppler für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Danke an Dennis Liesenhoff für die Hilfe bei der graphischen Visualisierung. Danke an Christopher Güsgen und Elena Jakisch für den Zuspruch auf den letzten Metern.

In Anteilnahme an den Betroffenen, die Teil der Lübecker HNSCC Kohorte sind, möchte ich zuletzt meinen Dank an diese und deren Angehörige aussprechen.

Persönliche Daten

Name Patrick Kuppler
Adresse Königstr 75
23552 Lübeck
Mobil 01575/3999809
E-Mail Patrick.Kuppler@gmx.de
Geburtsdatum / -ort 22. August 1991 in Dormagen



Werdegang und Ausbildung

2002-2011 Norbert Gymnasium Knechtsteden in Dormagen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

2008-2009 Edison High School in Tulsa, Oklahoma USA
Abschluss: High School Diploma

2011-2013 Ausbildung zum Rettungsassistent an der Medakademie Köln

2013-2014 Rettungsassistent in der Notfallrettung bei der Feuerwehr
Bergisch Gladbach

2014-2020 Medizinstudium an der Universität zu Lübeck

2017-2021 Doktorand am Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck

Ab 2021 Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für
Neurochirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
(UKSH), Campus Lübeck über ein Forschungsstipendium des
Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF)

Famulaturen und Praktisches Jahr

2017 Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck (1 Monat)

2018 Hausarztpraxis Dr. med. von Rath Travemünde (1 Monat)
St. Franziskus Hospital Köln – HNO (1 Monat)

2019 University of Utah – Plastic Surgery Department (2 Monate)

- 2019-2020 1. PJ-Tertial: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Segeberger Kliniken – Innere Medizin
- 2020 2. PJ-Tertial: Charité Universität Berlin – Vivantes Klinikum Friedrichshain – Neurochirurgie
3. PJ-Tertial: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Asklepios Westklinikum Hamburg – Chirurgie

Veröffentlichungen

- 2020 1. EVI1 as a Marker for Lymph Node Metastasis in HNSCC
 – Int. J. Mol. Sci.
2. NR2F6 as a Prognostic Biomarker in HNSCC – Int. J. Mol. Sci.
3. CDK19 as a Potential HPV-Independent Biomarker for Recurrent Disease in HNSCC – Int. J. Mol. Sci.
4. Recurrent HNSCC harbor an immunosuppressive tumor immune microenvironment suggesting successful tumor immune evasion – Clin. Cancer Res.
- 2021 5. Immunologic “Cold” Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck are Associated with an Unfavorable Prognosis – Front. Med.

Kenntnisse und Fähigkeiten

- Sprachkenntnisse Deutsch (Muttersprache)
 Englisch (Cambridge ESOL Level 2 Certificate in Advanced English C2)
 Latein (Latinum)
- Sonstiges Lübecker Tool Box Trainingscurriculum für Basisfertigkeiten der minimalinvasiven Chirurgie (2019)
 PADI AOWD

Lübeck, den 15.02.2021



Lübeck, den 15.02.2021

Selbstständigkeitserklärung

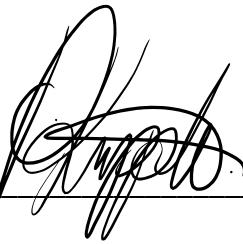
Ich, Patrick Ferdinand Kuppler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

**„Über den Aufbau einer Kopf-Hals-Karzinomgewebekohorte und ihren Nutzen am Beispiel
der Beschreibung der Tumorimmuninfiltration und der Rolle der EVI1 Expression“**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Lübeck, 14.07.2021

Ort, Datum



Unterschrift