

Aus dem Institut für Pathologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Sven Perner

**Immunhistochemische Untersuchung von transkriptionellen Cyclin-
abhängigen Kinasen mittels digitaler Bildauswertungssoftware in
Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Tobias Jagomast

aus Hamburg

Lübeck 2022

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dirk Hermes

Tag der mündlichen Prüfung: 1.2.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 1.2.2023

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	7
1.1	Übersicht	7
1.2	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs.....	7
1.2.1	Definition	7
1.2.2	Epidemiologie	7
1.2.3	Ätiologie.....	8
1.2.4	Therapie.....	9
1.2.5	Prognose.....	11
1.2.6	Biomarker.....	12
1.3	Zielproteine	13
1.3.1	CDK7	13
1.3.2	pMED1	15
1.3.3	CDK12	16
1.4	Bildanalyse.....	17
1.4.1	Immunhistochemische Biomarkerstudien	17
1.4.2	Auswertungsmodalitäten der quantitativen Immunhistochemie	18
1.5	Fragestellung und Hypothesen	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Patientenkohorten.....	21
2.2	Erstellung der immunhistochemisch gefärbten Objektträger	22
2.3	Digitalisierung.....	24
2.4	Auswertung	25
2.4.1	Manuelle digitale Bildanalyse	25
2.4.2	Automatisierte digitale Bildanalyse	25
2.4.2.1	<i>Color Deconvolution</i>	26
2.4.2.2	<i>Random Forest</i>	27
2.5	Vergleich von manueller und automatisierter digitaler Bildanalyse	30
2.5.1	Zelldetektion.....	30
2.5.2	Färbeintensitätsbestimmung.....	30
2.5.3	Vergleich des Positivindexes.....	31
2.5.4	Vergleich der Bearbeitungsdauer	31
2.6	Statistik.....	32
2.7	Votum der Ethikkommission	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Vergleich von manueller und automatischer digitaler Bildanalyse.....	35
3.1.1	Zelldetektion.....	35
3.1.2	Färbeintensitätsbestimmung	36

3.1.3	Vergleich des Positivindexes.....	40
3.1.4	Vergleich der Bearbeitungsdauer	42
3.2	Untersuchung der Expression der Zielproteine mittels digitaler Bildanalyse	43
3.2.1	CDK7 und pMED1.....	43
3.2.1.1	<i>Färbemuster von CDK7 und pMED1</i>	43
3.2.1.2	<i>Korrelation von CDK7- und pMED1-Expression</i>	44
3.2.1.3	<i>Prognostische Wertigkeit der CDK7- und pMED1-Expression</i>	45
3.2.1.4	<i>Korrelation der CDK7- und pMED1-Expressionen mit klinischen Daten</i>	51
3.2.1.5	<i>CDK7-Expression nach Lokalisation</i>	53
3.2.1.6	<i>CDK7-Expression in verschiedenen Tumorgewebearten</i>	54
3.2.1.7	<i>CDK7-Expression nach Immunprofil</i>	55
3.2.2	CDK12.....	57
3.2.2.1	<i>Färbemuster von CDK12</i>	57
3.2.2.2	<i>Korrelation der CDK12-Expression mit klinischen Daten</i>	57
3.2.2.3	<i>CDK12-Expression in verschiedenen Tumorgewebearten</i>	59
3.2.2.4	<i>Prognostische Wertigkeit der CDK12-Expression</i>	60
3.2.2.5	<i>CDK12-Expression nach Immunprofil</i>	62
4	Diskussion	63
4.1	Übersicht	63
4.2	Diskussion der Ergebnisse zum Vergleich der digitalen Bildanalyse	63
4.2.1	Ergebnisse	63
4.2.2	Schwächen.....	66
4.2.3	Stärken.....	67
4.2.4	Ausblick.....	68
4.3	Diskussion der Ergebnisse zu den Zielproteinen	69
4.3.1	Ergebnisse	69
4.3.1.1	<i>CDK7 und pMED1</i>	69
4.3.1.2	<i>CDK12</i>	72
4.3.2	Schwächen.....	74
4.3.3	Stärken.....	75
4.3.4	Ausblick.....	75
4.3.4.1	<i>CDK7 und pMED1</i>	75
4.3.4.2	<i>CDK12</i>	76
5	Zusammenfassung.....	79
6	Literaturverzeichnis.....	80
7	Anhänge.....	99
8	Danksagung.....	108
9	Lebenslauf.....	109
10	Publikationsliste	111

Abkürzungsverzeichnis

5-JKÜ	5-Jahres-krankheitsfreie-Überleben
5-JÜ	5-Jahres-Überleben
95%-KI	95%-Konfidenzintervall
95%-LoA	95% Limits of Agreement
95%-PI	95%-Prädiktionsintervalle
aDBA	automatische Digitale Bildanalyse
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
AUROC	Area under the ROC
BRCA1/2	BReast CAncer 1/2, early-onset
BSA	Bovines Serumalbumin
CAK	CDK-aktivierende Kinase
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CI	Chromogenintensität, Chromogenintensität
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DBA	Digitale Bildanalyse
DDR	DNA Damage Response and Repair
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DSIF	DRB Sensitivity Inducing Factor
DT	Decision Tree
EGFR	ermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERBB2	erb-b2 Receptor Tyrosin Kinase 2
EVI1	Ecotropic Viral Integration Site-1
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettet
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HED	Hämatoxylin-Eosin-DAB
HNSCC	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Hazard Ratios, Homologous Recombination
HRP	Meerrettichperoxidase
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie/immunhistochemisch
IL-6	Interleukin-6
IPS	Intronische Polyadenylierungssignale
IQR	Interquartilabstand
LKK	Lin's Koeffizient der Übereinstimmung
mDBA	manuelle Digitale Bildanalyse
ML	Machine Learning
mRNA	messenger-RNA
NELF	Negative Elongation Factor
OD	optische Dichte, Optische Dichte
OP	Operation
OSCC	Mundhöhlenkarzinome
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1
PI	Positivindex
PKK	Pearson Korrelationskoeffizient
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor
Rb	Retinoblastom-Protein
REMARK	Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies
RF	Random Forest
RGB	Rot-Grün-Blau
RNA	Ribonucleic Acid
RNAPII	RNA-Polymerase II
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROI	Region of Interest
SD	Standardabweichung
SE	Super-Enhancer

Ser2	Serine an Position 2
snRNA	small nuclear RNA
TA	Transcriptional Addiction
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TFIIH	Transkriptionsfaktor II H
TMA	Tissue Microarray
TPS	Tumor Proportion Score
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Übersicht

Die vorliegende Arbeit umfasst zwei zusammenhängende Themenkomplexe. Es wurde die Rolle der Proteine Cyclin-abhängige Kinase (CDK) 7, phospho-Mediator Untereinheit 1 (pMED1) und Cyclin-abhängige Kinase 12 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs untersucht. Hierzu wurde eine Tissue Microarray (TMA) Kohorte mit entsprechendem Tumorgewebe genutzt und diese mittels Immunhistochemie (IHC) gegen die Zielproteine angefärbt. Die Bilddaten wurden anschließend digital ausgewertet und die Ergebnisse mit den umfangreichen klinisch-pathologischen Daten der Patienten/-innen korreliert. Im Rahmen der digitalen Auswertung der IHC-Färbungen kamen zwei verschiedene Computerprogramme zum Einsatz. Darunter der Goldstandard des pathologischen Instituts der Universität zu Lübeck und ein neues Verfahren, welches als Teil der Arbeit etabliert wurde, um die Ergebnisse durch zwei Methoden unabhängig zu validieren.

Entsprechend dieser Themen wird in der Einleitung zuerst auf Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs und die untersuchten Proteine eingegangen. Im Anschluss erfolgt eine kurze Einführung in die Bildanalyse von IHC-Präparaten im Kontext von onkologischen Studien.

1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs

1.2.1 Definition

Bei ca. 90 % der Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs handelt es sich um Plattenepithelkarzinome (Vigneswaran und Williams, 2014). Im Englischen werden diese subsumiert unter der Bezeichnung Head and Neck Squamous Cell Cancer (HNSCC). Diese Gruppe umfasst vornehmlich Karzinome des Larynx, Pharynx und der Mundhöhle (Johnson et al., 2020). Die Karzinome haben ihren Ursprung in der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtrakts (Pai und Westra, 2009).

1.2.2 Epidemiologie

HNSCC betrifft insbesondere ältere Patienten/-innen. So liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter zwischen 57-62 Jahren. Allerdings erkranken in den letzten Jahren auch zunehmend jüngere Patienten/-innen unter 45 Jahren (Ryu et al., 2019). Unter den Erkrankten finden sich generell häufiger Männer (Johnson et al., 2020). Weltweit gesehen ist HNSCC die sechst häufigste Tumorentität mit 890.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Ferlay et al., 2019; Johnson et al., 2020).

Regional werden große Unterschiede beobachtet. Hochinzidenzgebiete liegen v.a. in Südost-Asien (Warnakulasuriya, 2009; Vigneswaran und Williams, 2014). In Deutschland erkranken jährlich ca. 17.000 Personen an Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs, hiervon versterben 7.200 Patienten/-innen (Wienecke und Kraywinkel, 2019).

In den vergangenen Jahren ist die Inzidenz von HNSCC angestiegen. Prognosen gehen von einer weiteren Zunahme der Erkrankung aus. Bis 2030 wird weltweit eine Inzidenz von 1.08 Millionen vorhergesagt (Ferlay et al., 2019; Johnson et al., 2020). Dabei unterliegt auch die Dynamik der Inzidenz regionalen Unterschieden. Mundhöhlenkarzinome und Larynxkarzinome werden gerade in den westlichen Ländern seltener, wobei hier jedoch für Oropharynxkarzinome ein Anstieg des Auftretens beobachtet wird (Ramqvist und Dalianis, 2010; Vigneswaran und Williams, 2014).

1.2.3 Ätiologie

Die Entwicklung in der Epidemiologie von HNSCC muss zusammen mit der Ätiologie dieser Karzinome betrachtet werden. Im Wesentlichen sind folgende Hauptrisikofaktoren für die Karzinogenese von HNSCC beschrieben. Zum einen tragen Rauchen sowie der regelmäßige Konsum von Alkohol zur Entstehung von HNSCC bei (Blot et al., 1988; Johnson et al., 2020). Zum anderen wurde durch die Erkenntnisse der Forschung der letzten Jahre das humane Papillomavirus (HPV), insbesondere HPV Typ 16, als ein weiterer Auslöser identifiziert, der wohl weitestgehend unabhängig von anderen Risikofaktoren zur Krebsentstehung führt (Gillison et al., 2000; Johnson et al., 2020).

Heutige Hypothesen erklären die Abnahme der Inzidenz von HNSCC in den westlichen Ländern, durch die dort rückläufige Zahl der Raucher/-innen. Dem gegenübersteht die beobachtete Zunahme an Oropharynxkarzinomen (Sturgis und Cinciripini, 2007; Gillison et al., 2012; Marur und Forastiere, 2016). Diese Karzinome sind häufig mit einer HPV-Infektion assoziiert und weisen eine günstigere Prognose auf (Gillison et al., 2000; Li et al., 2003; Fakhry et al., 2008), sodass im Jahr 2018 durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) die Distinktion von Oropharynxkarzinomen mit positiven bzw. negativen HPV-Nachweis eingeführt wurde, um der unterschiedlichen Prognose gerecht zu werden (Huang und O’Sullivan, 2017; Chow, 2020). Auch für andere Karzinome der HNSCC-Gruppe scheint der Nachweis von HPV prognostisch günstig zu sein (Bryant et al., 2018).

HPV-assoziierte HNSCC betreffen in erster Linie jüngere Patienten/-innen. Das mediane Erkrankungsalter bei HPV-positiven Karzinomen beträgt 58 Jahre (Windon et al., 2018; Johnson et al., 2020). In der Genese von HPV-positiven Tumoren befällt das Virus die Zellen

der Basalschicht. Es kommt zu einer Förderung der Proliferation (Egawa et al., 2015; Pullos et al., 2015; Leemans et al., 2018). Die hauptverantwortlichen Onkogene sind E6 und E7. E6 vermittelt den vermehrten Abbau vom Tumorsuppressor p53 (Scheffner et al., 1993; zur Hausen, 1996). E7 greift in den Retinoblastom-Protein-Signalweg (Rb) ein, indem es den Tumorsuppressor Rb inaktiviert (Whyte et al., 1988; zur Hausen, 1996). Rb hemmt physiologischerweise die Expression von p16 (Klaes et al., 2001; von Knebel Doeberitz, 2002). Daher kommt es bei HPV-positiven Karzinomen zu einer Überexpression des p16-Proteins, welches als Surrogatparameter genutzt wird, um eine Infektion nachzuweisen (Lu et al., 2003; Shi et al., 2009; Jiarpinitnun et al., 2020). Weitere Besonderheit von HPV-positiven Tumoren sind eine geringere Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression, sowie eine stärkere Infiltration durch Immunzellen (Kumar et al., 2008; Westra, 2009; Wang et al., 2019a).

HPV-negative Karzinome weisen im Gegensatz dazu eine deutlich heterogenere Biologie auf. In Analogie zu HPV-positiven Tumoren sind frühe Ereignisse der Verlust der Funktion von p53 und p16 entweder durch Mutation oder chromosomale Instabilität (Poeta et al., 2007; Agrawal et al., 2011; Alsahafi et al., 2019). In ca. 90 % der Fälle wird eine hohe EGFR-Expression beobachtet, welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Bonner et al., 2010). Daneben kommt es zu verschiedenen Mutationen in Tumorsuppressorgenen sowie in Onkogenen, wobei die Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha am häufigsten mutiert vorliegt (Agrawal et al., 2011; Johnson et al., 2020).

Neben Risikoverhalten und HPV-Infektionen existieren wahrscheinlich auch genetische Dispositionen, die zur Entstehung von HNSCC führen können. Für erstgradige Nachkommen eines HNSCC-Erkrankten wurde im Vergleich zur Normalbevölkerung ein doppelt so hohes Risiko ermittelt, ebenfalls HNSCC zu entwickeln (Negri et al., 2009; Gingerich et al., 2018).

1.2.4 Therapie

Die Einteilung von HNSCC basiert auf der UICC-Klassifikation. Wobei sich alle folgenden Angaben auf die 8. Version der UICC-Klassifikation beziehen (Wittekind, 2020). Die UICC-Stadien I/II werden als frühe, lokal begrenzte Stadien angesehen. Die Stadien III/IV kennzeichnen fortgeschrittene Erkrankungsverläufe (Chow, 2020). Die Therapie von HNSCC fußt im Wesentlichen auf drei Modalitäten, dies sind die chirurgische Intervention, Chemotherapie und Radiotherapie (Chow, 2020).

Frühe Stadien der Erkrankung werden in der Regel durch ein chirurgisches Vorgehen oder eine definitive Radiotherapie behandelt. Beide Ansätze sind als gleichwertig in Bezug auf das Behandlungsergebnis anzusehen (Pfister et al., 2014; Chow, 2020). Die Wahl der Modalität hängt von der Lokalisation und den zu erwartenden Nebenwirkungen ab (Johnson et al., 2020).

In fortgeschrittenen Stadien kommen multimodale Ansätze zum Einsatz (Chow, 2020). Generell werden hier kleinere gut erreichbare Tumore primär durch eine Operation (OP) therapiert. Je nach Risikoprofil schließt sich eine adjuvante Radiotherapie oder eine Radiochemotherapie an (Bernier et al., 2004). Wenn eine OP nur mit erheblichen Funktionseinbußen einhergeht oder die Lokalisation ein derartiges chirurgisches Vorgehen nicht erlaubt, ist in erster Linie eine primäre Radiochemotherapie als kurative Behandlungsoption indiziert (Pignon et al., 2009; Chow, 2020).

Rezidive sind bei HNSCC häufig und betreffen in fortgeschrittenen Stadien ca. 50 % der Patienten/-innen (Argiris et al., 2008). Rezidive entwickeln sich meist innerhalb der ersten zwei Jahre nach Diagnose (Argiris et al., 2008; Ribeiro et al., 2017). Die Therapieoptionen bestehen hier in einer Salvage-OP oder einer Radiotherapie. Da allerdings viele Patienten/-innen bereits durch die initiale Therapie vorbestrahlt sind und eine Erhöhung der Gesamtdosis dadurch nur bedingt möglich ist, wird häufig eine Kombinationschemotherapie durchgeführt (Vermorken et al., 2008; Chow, 2020).

In den Bemühungen nach zielgerichteteren Therapien wurde 2008 mit dem EGFR-Inhibitor Cetuximab nach mehr als 30 Jahren wieder ein neuer Wirkstoff für die HNSCC-Therapie zugelassen (Ivanyi und Eggers, 2019). Indiziert ist die Therapie in Kombination mit einer platinhaltigen Chemotherapie bei Patienten/-innen mit rezidiviertem oder metastasiertem HNSCC. Die Zulassung basiert auf den Daten der EXTREME Studie, welche einen Überlebensvorteil von 2.7 Monaten zeigte (Vermorken et al., 2008).

Ungefähr 10 Jahre später mit wachsendem Verständnis für die Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem wurde der gegen das Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) gerichtete Checkpoint-Inhibitor Nivolumab zugelassen (Ivanyi und Eggers, 2019). PD-1 ist ein immunsuppressiver Rezeptor auf T-Zellen. Tumorzellen sind in der Lage, Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1 (PD-L1) zu exprimieren. PD-L1 vermittelt über Interaktion mit PD-1 eine Inhibition der Immunzellen, sodass die Tumorzellen einer Immunantwort entgehen. PD-1-Inhibitoren können diese Maskierung der Tumorzellen aufheben (Iwai et al., 2002; Chamoto et al., 2020). Indiziert ist die Gabe von Nivolumab in Monotherapie bei

Progression während oder nach einer platinbasierten Chemotherapie. Die Zulassung basiert auf der CheckMate-141 Studie, nachdem ein verbessertes Gesamtüberleben von 2.4 Monaten festgestellt wurde (Ferris et al., 2016). Auch wenn die Studie Hinweise lieferte, dass besonders Patienten/-innen mit einem erhöhtem PD-L1 Tumor Proportion Score (TPS) (der TPS gibt den Anteil positiv gefärbter Tumorzellen in der IHC an) oder einem positiven p16-Status von der Therapie profitierten, so wird auch bei Nichtzutreffen dieser Kriterien in Ermangelung anderer Therapieoptionen eine Behandlung mit Nivolumab durchgeführt (Adelstein et al., 2017).

In Anbetracht der steigenden Zahl an HPV-positiven Karzinomen sind Präventionsansätze für diese Gruppe von HNSCC-Patienten/-innen von besonderem Interesse. Die Zulassung der bereits verfügbaren Impfstoffe gegen HPV-Risikotypen wurde dementsprechend 2020 von der Federal Drug Administration um die Indikation HNSCC-Prävention erweitert (Smalley Rumfield et al., 2020; Diana und Corica, 2021).

Neben Fortschritten in der medikamentösen Behandlung wurden in den letzten Jahren auch durch technische Neuerungen erhebliche Fortschritte erzielt, um die Nebenwirkungen der Therapien weiter zu reduzieren. Die Radiotherapien wurden durch die Einführung der Intensity modulated Radiotherapy gewebeschonender (Gupta et al., 2018) und das funktionelle Resultat der OPs wurde durch Laserchirurgie und robotergestützte OPs verbessert (Moore et al., 2012; Weiss et al., 2017). Dennoch geht die Behandlung, insbesondere wenn verschiedene Modalitäten kombiniert werden, meist mit erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität einher (Singer et al., 2012; Osazuwa-Peters et al., 2018; Ranta et al., 2021).

1.2.5 Prognose

Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von HNSCC-Patienten/-innen über alle Stadien hinweg beträgt 50 % (Chin et al., 2006; Leemans et al., 2018). Allerdings werden 60 % der Patienten/-innen erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert (Chow, 2020). Diese entwickeln in ca. 50 % der Fälle und damit deutlich häufiger als Patienten/-innen mit lokal begrenzte Stadien Rezidive oder Fernmetastasen (Argiris et al., 2008; Denaro et al., 2016). Die 5-Jahres-Überlebensrate ist deutlich reduziert und beträgt 35 %. Wohingegen Patienten/-innen der UICC-Stadien I/II eine 5-Jahres-Überlebensrate von 75 % haben (Chin et al., 2006).

Bedingt durch die Lokalisation haben Hypopharynxkarzinome die schlechteste Prognose. Sie werden zumeist erst spät symptomatisch und daher erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt durchschnittlich 35 % (Kuo et al., 2014).

Für HNSCC wurden verschiedene klinisch-prognostische Indikatoren identifiziert, hierzu zählen in erster Linie der Raucherstatus, der Alkoholkonsum, das Alter und das Tumorstadium (Blot et al., 1988; Cadoni et al., 2017). Daneben spielt auch der HPV-Status eine entscheidende Rolle für die Prognose. Generell führt ein positiver HPV-Status zu weniger Rezidiven und einer besseren Prognose (Fakhry et al., 2008; Asheer et al., 2020). Bei positivem HPV-Status zeigte sich eine 8-Jahres-Überlebensrate von 71 % im Gegensatz zu 30 % bei negativem HPV-Nachweis (Nguyen-Tan et al., 2014; Chow, 2020). Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob das allgemein niedrigere Alter bei Diagnosestellung und die damit einhergehenden Abwesenheit von Komorbiditäten diese Unterschiede ausreichend begründet. Eventuell ist die Ursache auch in der molekularen Pathogenese HPV-assoziiierter Karzinome zu suchen (Alsahafi et al., 2019). Bestätigt ist jedoch, dass HPV-positive Karzinome besser auf Radio- und Chemotherapie ansprechen (Fakhry et al., 2008; Nguyen-Tan et al., 2014).

1.2.6 Biomarker

Da die meisten Behandlungsoptionen mit erheblichen Nebenwirkungen und Einschränkungen der Lebensqualität einhergehen, besteht ein großes Interesse HNSCC-Patienten/-innen entsprechend ihrem Risiko zu stratifizieren (Nguyen-Tan et al., 2014). Bislang rechtfertigen die verfügbaren Studien, wie der De-ESCALaTE HPV Trial, noch keine Deintensivierung der Therapie bei positivem HPV-Status (Mehanna et al., 2019). Eine retrospektive Analyse basierend auf der 8. UICC Edition zeigte, dass sich das Gesamtüberleben ansonsten verkürzte (Cheraghlou et al., 2018).

Bei EGFR-Überexpression konnte eine schlechtere Prognose bestätigt werden (Bonner et al., 2010; Johnson et al., 2020) und es gibt Hinweise auf einen prädiktiven Wert der PD-L1-Expression für eine anti-PD-1-Therapie (Ferris et al., 2016; Adelstein et al., 2017).

Andere Biomarker, die eine solche prognostische oder therapeutische Einteilung zulassen würden, fehlen gänzlich in der klinischen Routine, wären aber von großer Relevanz, um bspw. adjuvante Therapieentscheidungen zu leiten (McShane et al., 2005). Um hier den aktuellen Stand der Forschung zu erweitern, wurden die drei Proteine CDK7, pMED1 und CDK12 auf ihre potenzielle klinische Relevanz in HNSCC untersucht.

1.3 Zielproteine

Die Fehlregulation von Zellzyklus und Transkription sind wichtige Charakteristika von Tumorzellen und maßgeblich an der Tumorentstehung und Progression beteiligt. CDKs und assoziierte Proteine übernehmen wichtige Aufgaben in der Regulation der Transkription sowie des Zellzyklus und sind daher von großem Interesse für die Tumorforschung (Kwiatkowski et al., 2014; Bradner et al., 2017; Sengupta und George, 2017; Fisher, 2018; Galbraith et al., 2019).

1.3.1 CDK7

Insbesondere CDK7 nimmt unter den CDKs eine entscheidende Rolle ein. CDK7 besitzt zwei Hauptfunktionen. Zusammen mit Cyclin H und Menage a trois 1 bildet CDK7 den CDK-activating Kinase (CAK) Komplex (Shiekhhattar et al., 1995). In der Kontrolle des Zellzyklus phosphoryliert dieser CDK1, CDK2, CDK4 und CDK6 (Larochelle et al., 2007; Fisher, 2012; Schachter et al., 2013; Patel et al., 2016). Daneben ist CAK Bestandteil des Transkriptionsfaktors II H (TFIIH) (Shiekhhattar et al., 1995). Während der Initiation der Transkription phosphoryliert CDK7 die RNA-Polymerase II (RNAPII) an Serin in der Position 5 und 7 und vermittelt so den Übergang in die RNAPII Pause (Glover-Cutter et al., 2009; Sampathi et al., 2019).

Nilson et. al untersuchten die darauffolgenden molekularen Signalwege. Der DRB Sensitivity Inducing Factor (DSIF) und Negative Elongation Factor (NELF) werden zur RNAPII rekrutiert. Der Übergang in die Elongation wird durch CDK9 und Cyclin T1 gesteuert, welche den Positive Transcription Elongation Factor (P-TEFb) Komplex bilden. CDK9 phosphoryliert die RNAPII, DSIF und NELF, wodurch sich NELF vom RNAPII Komplex löst und den Promoter Escape vermittelt (Nilson et al., 2015). Interessanterweise phosphoryliert CDK7 CDK9, womit die Formation von P-TEFb erst ermöglicht wird (Larochelle et al., 2012; Mbonye et al., 2018).

Durch Inhibition von CDK7 konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion der paused RNAPII (z. Dt. pausiert, Zustand der RNAPII kurz nach der Initiation) kommt. Es wird vermutet, dass durch fehlende Phosphorylierung eines noch unbekannten Faktors dieser an der RNAPII gebunden bleibt und die Rekrutierung von NELF und DSIF verhindert. Die effektive Integration von aktivierenden Signalen v.a. von sogenannten Super Enhancern (SE) während dieser Phase wird so verhindert und die RNAPII wandert langsam in die Genregion und beginnt mit einer ineffektiven Transkription (Nilson et al., 2015).

Besonders Tumorzellen sind aber auf eine effektive Transkription angewiesen. Ihre Abhängigkeit von speziellen Transkriptionsprogrammen wird als Transcriptional Addiction (TA) bezeichnet (Bradner et al., 2017). TA zugrunde liegt häufig die dauerhafte Aktivierung bestimmter Gene durch Super Enhancer. Sengupta und George beschreiben in ihrem Übersichtsartikel Eigenschaften von SEs. Analog zu Enhancern Regionen der DNA binden SE Transkriptionsfaktoren. Im Unterschied zu anderen Enhancer Regionen bilden SE Cluster, wo Transkriptionsfaktoren akkumulieren und zu einer stark gesteigerten Aktivierung der betroffenen Gene führen. In Zellen vermitteln SE für gewöhnlich die Differenzierung der Zellen. In entarteten Zellen führen sie meist zu einer gesteigerten Proliferation (Sengupta und George, 2017). TA wurde bereits in HNSCC beschrieben (Masuda et al., 2010).

In diversen Tumoren sind bestimmte Schlüsselonkogene bekannt, auf deren Inhibition die Tumorzellen empfindlich bis letal reagieren. Für viele Karzinome sind derartig umschriebene Abhängigkeiten der Tumorzellen von bestimmten Onkogenen noch nicht identifiziert (Sanchez-Vega et al., 2018). Bei HNSCC handelt es sich um eine Gruppe von Karzinomen, welche sich durch große genetische Heterogenität auszeichnet (Ha et al., 2009; Alsahafi et al., 2019). Dies stellt eine Herausforderung für die Entwicklung von gezielten Therapien dar. Allerdings sind häufig Cluster von Genen bekannt, die in diesen Karzinomen hochreguliert sind (Lawrence et al., 2015; Canning et al., 2019). Gerade in Tumoren mit heterogener Biologie stellt die Inhibition der Transkription dieser Cluster von überexprimierten Genen eine elegante Therapieoption dar (Wang et al., 2015; Kim et al., 2020). Es existierten bereits mehrere Wirkstoffe, welche tlw. selektiv CDK7 inhibieren und so mit der TA interferieren. In präklinischen Studien hat bspw. der CDK7-Inhibitor THZ1 bereits antineoplastische Wirkung gezeigt (Christensen et al., 2014; Lu et al., 2019; Wang et al., 2019b; Zhong et al., 2019; McDermott et al., 2020; Zhang et al., 2020b).

Darüber hinaus scheint CDK7 auch einen Einfluss auf das Immunzellinfiltrat von Tumoren zu haben. Zhang et al. konnten zeigen, dass eine Inhibition des Enzyms zu genomischer Instabilität der Tumorzellen führt und mit einem erhöhten Influx von Immunzellen in den Tumor assoziiert ist (Zhang et al., 2020a). Zudem wurden kürzlich Hinweise gefunden, dass CDK7 die Expression von PD-L1 steigern könne (Wang et al., 2020).

Viele Proteinexpressionsstudien konnten bereits den prognostischen Wert der CDK7-Expression in verschiedenen Entitäten belegen. Bei CDK7-Überexpression zeigte sich für diverse Karzinome ein signifikant schlechteres Überleben der Patienten/-innen sowie tlw.

eine Assoziation mit höherem Grading und T-Stadium (Zhang et al., 2013; Patel et al., 2016; Wang et al., 2016; Jiang et al., 2019; Kim et al., 2020).

1.3.2 pMED1

Mediator of RNA Polymerase II Transcription Subunit 1 (MED1) ist eine Untereinheit des Multiproteinkomplexes Mediator. Mediator ist ebenfalls essenziell an der Regulation der Transkription beteiligt und fungiert als eine Art Brücke zwischen den Transkriptionsfaktoren, die an den Enhancer-Regionen gebunden sind und der Transkriptionsmaschinerie (Flanagan et al., 1991; Allen und Taatjes, 2015). Dabei wird die Bildung des Präinitiationskomplexes unterstützt (Allen und Taatjes, 2015; Soutourina, 2018). pMED1 ist die phosphorylierte und aktivierte Form von MED1 einem Bestandteil des Mediator-Komplexes. Diverse Kinasen können MED1 phosphorylieren darunter auch CDK7, welche MED1 an Position T1457 phosphoryliert (ur Rasool et al., 2019). Durch Phosphorylierung kommt es zu einer gesteigerten Bindung von pMED1 an den Mediator-Komplex. Interessanterweise ist MED1 nur in 20 % der Fälle Teil des Mediator-Komplexes, was auf eine spezielle Rolle schließen lässt und die Spezifität von Therapien erhöhen könnte (Malik et al., 2004; Belakavadi et al., 2008).

In verschiedenen Tumoren wurde eine Fehlexpression von MED1 beobachtet. Die vermittelten Effekte sind tumorspezifisch, wobei MED1 sowohl als Onkogen sowie auch als Tumorsuppressorgen fungieren kann. Proteinexpressionsstudien zeigten, dass in Blasenkarzinomen eine niedrige Expression von MED1 mit einem aggressiveren Tumorphänotyp assoziiert ist (Klümper et al., 2017), gleiches wurde in Studien zu Adenokarzinomen der Lunge nachgewiesen (Yun et al., 2011). Im Falle einer niedrigen Expression von MED1 konnte gezeigt werden, dass die Transkription von Tumorsuppressorgen sank, wodurch die Progression gefördert wurde (Gade et al., 2009). In hormonabhängigen Tumoren der Brust und der Prostata, hingegen führte eine Überexpression zu proliferativen Effekten (Vijayvargia et al., 2007; Cui et al., 2012). Im Falle von Prostatakarzinom konnte nachgewiesen werden, dass MED1 von CDK7 phosphoryliert und aktiviert wurde. In Folge kam es zu einer verstärkten Expression von Onkogenen (ur Rasool et al., 2019).

CDK7 und pMED1 sind bedeutsame Proteine für die Forschung, aufgrund ihrer weitreichenden Funktionen während der Transkription. In Tumorzellen vermitteln diese beiden Proteine den Effekt der SE auf die Transkriptionsmaschinerie. Die Unterbrechung dieser aberranten Expressionsprogramme stellt eine vielversprechende Option für zielgerichtete Tumorthérapien dar und auch ihre prognostische Relevanz konnte vielfach

bestätigt werden (Christensen et al., 2014; Nilson et al., 2015; Bradner et al., 2017; Galbraith et al., 2019). Ebenso ist das Zusammenspiel beider Proteine interessant, da CDK7 die Assoziation von MED1 an Mediator vermitteln kann (Belakavadi et al., 2008; Rasool et al., 2019).

1.3.3 CDK12

CDK12 wurde zuerst 2001 als Transkriptions-assoziierte CDK beschrieben (Ko et al., 2001; Pilarova et al., 2020). Wie andere CDKs wird CDK12 durch Interaktion mit Cyclin K aktiviert (Blazek et al., 2011; Lui et al., 2018). CDK12 phosphoryliert unter anderem RNAPII am Serin in der Position 2 (Ser2) (Cheng et al., 2012; Tellier et al., 2020). Aktuell ist CDK12 von großer Relevanz für die Forschung, da Studien zeigten, dass durch Inhibition nicht die globale Transkription gehemmt wird. Vielmehr steuert CDK12 selektiv die Transkription von DNA Damage Response and Repair (DDR) Genen. Deren Expression sank nach CDK12-Inhibition (Krajewska et al., 2019). Eine Dysfunktion von CDK12 führt so über verminderte Transkription von DDR-Genen zu einer gesteigerten Tumormutationslast und damit zur Entstehung von Neoantigenen (Li et al., 2020a). Diese Neoantigene können eine Infiltration von Immunzellen vermitteln (Wu et al., 2018). Daraus ergeben sich interessante Möglichkeiten für Therapien mit Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitoren (PARP) oder PD-1-Inhibitoren, worauf in der Diskussion detaillierter eingegangen werden soll (Bajrami et al., 2014; Joshi et al., 2014; Antonarakis et al., 2020; Li et al., 2020b).

Entgegen ursprünglichen Annahmen erklärt sich diese Selektivität nicht durch spezielle Rekrutierung von CDK12 zu Genen der DDR. Vielmehr wurde belegt, dass CDK12 in der Tat die globale Transkription reguliert (Tellier et al., 2020). Durch die Arbeiten von Dubbury et al. und später ergänzt von Krajewska et al. wurde ein Model entwickelt, das eine Erklärung für die gesteigerte Empfindlichkeit von DDR-Genen für eine CDK12-Inhibition bietet und den scheinbaren Widerspruch zu einer global unbeeinflussten Transkription auflöst (Dubbury et al., 2018; Krajewska et al., 2019).

Durch Inhibition von CDK12 nahm vor allem die Nutzung intronischer Polyadenylierungssignale (IPS) während der Transkription zu. Dadurch entstanden vorzeitig polyadenylierte und damit verkürzte messenger-RNA (mRNA) Transkripte. Gerade Gene der DDR sind lang und verfügen über ein niedriges Verhältnis von U1 small nuclear-RNA (snRNA) und IPS (Krajewska et al., 2019). U1 snRNA verhindert in der Regel die Nutzung von IPS (Berg et al., 2012; Oh et al., 2017). Derzeit wird vermutet, dass durch CDK12-abhängige Phosphorylierung von Ser2 die Nutzung von IPS während der regulären

Transkription unterbunden wird und eine effiziente Elongation vermittelt wird, sodass vollständige Transkripte entstehen (Dubbury et al., 2018). Eine fehlende Phosphorylierung auf der anderen Seite führt so zu einer ineffizienten Elongation mit steigender Wahrscheinlichkeit für die Nutzung von IPS (Dubbury et al., 2018). Passend zu dieser Annahme haben Studien gezeigt, dass langsamere Elongationsraten häufiger mit der Nutzung von IPS einhergehen. Nach Verlust von CDK12 reduzierte sich der Anteil an RNAPII in der Elongationsphase (Dubbury et al., 2018).

Interessanterweise konnte in Abhängigkeit von der Dosierung von CDK12-Inhibitoren in niedriger Dosierung eine selektive Hemmung von DDR-Genen erreicht werden, wohingegen höhere Dosierungen die SE-abhängige Transkription inhibierten, ohne jedoch die vitale Transkription signifikant zu beeinflussen (Zhang et al., 2016; Paculová und Kohoutek, 2017).

Im Gegensatz zur Rolle von CDK12 als Zielproteine einer medikamentösen Therapie ist über die prognostische Implikation dieses Enzyms sehr viel weniger bekannt (Liu et al., 2020; Thanindratarn et al., 2020). CDK12 wurde aufgrund des zu vermutenden hohen translationalen Potenzials und funktionellen Analogien zu CDK7 für die Studie ausgewählt.

1.4 Bildanalyse

1.4.1 Immunhistochemische Biomarkerstudien

In der IHC werden ausgewählte Zielantigene in histologischen Präparaten mittels Antikörper markiert. Die Antikörper sind an bestimmte Nachweissysteme gekoppelt (Ramos-Vara, 2005). In IHC-Biomarkerstudien werden klinische Informationen der Patienten/-innen in der Zusammenschau mit der Expression des Proteins in den Gewebeproben betrachtet und ausgewertet. Derartige Untersuchungen, wie hier vorliegend zu CDK7, pMED1 und CDK12, sind ein unverzichtbarer Bestandteil der heutigen onkologischen Forschung, um den prognostischen und/oder prädiktiven Wert verschiedener Proteine zu bestimmen (Kim et al., 2016).

Das Ausgangsmaterial für IHC-Untersuchungen ist meist Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe, welches in der klinischen Routine gewonnen wird. Weltweit lagern pathologische Institute eine enorme Anzahl an derartigen Proben (Gaffney et al., 2018). Kohorten zur Beantwortung neuer Fragestellungen können zügig zusammengestellt werden. TMAs sind in diesem Zusammenhang Objektträger, auf die hunderte Gewebeproben aufgebracht werden, um anschließend simultan gefärbt und analysiert zu werden (Bubendorf et al., 2001; Behling und Schittenhelm, 2018; Ribbat-Idel et al., 2021a).

Die TMA-basierte Forschung und die Automatisierung der Färbungen haben dazu geführt, dass die Größe der Untersuchungskohorten stark gestiegen ist (Bubendorf et al., 2001). Ist ein Biomarker von klinischer Relevanz und validiert, so kann die Färbung zügig in histologische Routineuntersuchungen implementiert werden, aufgrund der weit verbreiteten Verfügbarkeit des hierzu notwendigen labortechnischen Instrumentariums.

1.4.2 Auswertungsmodalitäten der quantitativen Immunhistochemie

Die Auswertung von IHC-Studien in Bezug auf Biomarker erfolgt oft durch einen/eine Pathologen/-in rein visuell unter dem Mikroskop. Häufig angewandte Scoring Systeme beziehen sich auf die Färbeintensität (= Chromogenintensität (CI)) und den Anteil gefärbter Tumorzellen (= Positivindex (PI)) und verrechnen diese beiden Werte zu einem quantitativen Maß für die zu determinierende Antigenpräsenz (Kim et al., 2016, 2020; Wang et al., 2016; Aeffner et al., 2017; Jiang et al., 2019).

Jedoch birgt dieser Ansatz zahlreiche Nachteile. Visuelles Scoring ist anfällig für Inter- und Intraobserver-Variabilität, was die Reproduzierbarkeit von derartigen Studien reduziert (Dobson et al., 2010; Gavrielides et al., 2011; Braun et al., 2013; Aeffner et al., 2017). Die Nuancen zwischen positiven und negativen Zellen können je nach Antikörper gering sein und die Auswertung erschweren. Einem entsprechend mit dem Auge kalibrierten Schwellenwert zur Positiv-/Negativedisktion mangelt es an Konstanz. Ein stetiges Maß zur Bestimmung der Antigenlevel, welches ohne Grenzwerte auskommt, ist daher bei nuancierten Färbemustern vorzuziehen (Cregger et al., 2006; Feuchtinger et al., 2015).

Digitale Bildanalyse (DBA) Software stellt hier eine sinnvolle Erweiterung dar. Gängige Programme erlauben es, stetige Maße für die Intensität der Färbung zu bestimmen, welche wiederum ausreichend genau die Antigenlevel widerspiegeln (Matkowskyj et al., 2003; Krajewska et al., 2009; Helps et al., 2012). Mit steigender Computerleistung und Verfügbarkeit von Scannern für histologische Objektträger, ist die digitale Pathologie bereits in vielen Arbeitsgruppen und Laboren verbreitet und hat sich in Studien als bewährte Alternative zu visuellen Auswertungsmethoden erwiesen (Braun et al., 2013; Feuchtinger et al., 2015). Jedoch bestehen auch zwischen den verfügbaren Softwareprogrammen Unterschiede.

In Programmen der manuellen digitalen Bildanalyse (mDBA) muss der/die Nutzer/-in die sog. Region of Interest (ROI), in welcher die Messungen erfolgen sollen, in den gescannten Bildern markieren. Im Falle von onkologischen Fragestellungen könnten dies Tumorzellpopulationen oder auch Immunzellen sein. Dieser Ansatz ist für große Kohorten

sehr zeitaufwendig und birgt die Gefahren der Ungenauigkeit aufgrund von Ermüdung des/der Untersuchers/-in (Dobson et al., 2010; Ong et al., 2010; Braun et al., 2013). Die Implementierung von Machine Learning (ML) Algorithmen bietet einen vielversprechenden Weg die Erkennung der ROI zu automatisieren. Basierend auf Trainingsdatensätzen erlaubt eine derartig automatisierte digitale Bildanalyse (aDBA) die selbstständige Segmentierung und Klassifizierung der eingescannten Gewebeproben durch entsprechende Programme (Rizzardi et al., 2012; Polan et al., 2016; Bonte et al., 2018; Loughrey et al., 2018; Martino et al., 2020; Viratham Pulsawatdi et al., 2020).

Vorausgegangene Publikationen zeigten für beide digitale Verfahren eine starke Korrelation mit der visuellen Auswertung (Ong et al., 2010; Braun et al., 2013; Loughrey et al., 2018). Eine weitere Studie demonstrierte ebenfalls eine große Übereinstimmung der Messwerte von mDBA und aDBA, allerdings wurde nur eine einzelne Kohorte untersucht (Rizzardi et al., 2012). Es fehlt bisher die Überprüfung, ob beide Konzepte der DBA gleichermaßen zur Durchführung einer Biomarkerstudie geeignet sind, um aus den Ergebnissen sich deckende Schlüsse ziehen zu können.

1.5 Fragestellung und Hypothesen

Diese Arbeit untersuchte CDKs mit hohem translationalem Potenzial und ein assoziiertes Protein. Hierfür wurde eine klinisch sehr umfangreich charakterisierte TMA-Kohorte von HNSCC-Patienten/-innen herangezogen und diese mittels IHC hinsichtlich der Expression dieser Proteine untersucht. Die anschließende Auswertung erfolgte unter dem Einsatz von mDBA und aDBA. Wie im Abschnitt Biomarker dargestellt, mangelt es für HNSCC an prognostischen Biomarkern. Aufgrund der Beeinträchtigung der Lebensqualität, welche mit den momentanen Therapieoptionen einhergeht, besteht ein großes Interesse daran, Patienten/-innen eine risikoadaptierte Therapie und Nachsorge zu empfehlen. Vorherige Proteinexpressionsstudien bezüglich CDK7, pMED1 und CDK12 wiesen bereits auf eine klinische Relevanz dieser Proteine hin. In HNSCC sind die genannten Proteine in diesem Kontext noch nicht charakterisiert worden. Das Wissen darum könnte künftig helfen, die Prognose von Patienten/-innen besser einzuschätzen, sowie Rationale für weitere funktionelle Untersuchungen in in-vitro HNSCC-Modellen generieren.

Der zeitlich aufwendigste Arbeitsschritt in der Biomarkerforschung war bislang die Auswertung der IHC-Färbung, welche zusätzlich pathologisches Hintergrundwissen des/der Untersuchers/-in voraussetzt. Die Etablierung automatisierter Arbeitsabläufe unter Nutzung

von ML-Algorithmen, bietet daher eine vielversprechende Möglichkeit künftige Forschung zu beschleunigen.

Um die Bedeutung der Expression von CDK7, pMED1 und CDK12 in HNSCC zu untersuchen und ein neues Verfahren der aDBA zu testen, wurde ein Arbeitsplan mit zwei Schritten und entsprechenden Hypothesen erstellt.

Zuerst wurden für die Evaluation der aDBA vier TMA-Kohorten mit Tumorgewebe ausgewählt, die verschiedene Tumorarchitekturen, sowie nukleäre und zytoplasmatische Färbungen abbildeten. Für diese Kohorten wurden Messwerte zur CI und dem PI erhoben und die Ergebnisse von aDBA und mDBA verglichen. Es wurde die Hypothese formuliert, dass die Daten eine hohe Korrelation aufweisen würden, sodass beide Verfahren Anwendung in einer Proteinexpressionsstudie finden könnten. Es wurde weiter davon ausgegangen, dass die Ergebnisse der mDBA, dem momentanen Goldstandard des pathologischen Instituts der Universität zu Lübeck, mit der aDBA im Rahmen von Proteinexpressionsstudien reproduziert werden können.

Zweitens sollte die Expression von CDK7 und pMED1, CDK12 in einer klinisch umfangreich charakterisierten Kohorte von HNSCC-Patienten/-innen computergestützt bestimmt werden. Aufbauend auf dem ersten Schritt des Arbeitsplans kamen in diesen Proteinexpressionsstudien mDBA und aDBA zum Einsatz, um die Ergebnisse durch diese zwei unabhängigen Verfahren zu validieren. Für die Untersuchung standen verschiedene Gewebeproben von Primartumoren, Rezidiven, Lymphknoten und Fernmetastasen zur Verfügung. Zwischen diesen Proben sollte die Expression verglichen werden und des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Zielproteine eine Assoziation mit den klinisch-pathologischen Daten der Patienten/-innen aufweisen. Die Hypothese war es, dass analog zu bereits publizierten Studien in anderen Entitäten und entsprechend ihrer Biologie die Expressionen von CDK7, pMED1 und CDK12 einen Einfluss auf die Aggressivität des Tumors und die Prognose von HNSCC-Patienten/-innen haben.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkohorten

Für die Studien zur Expression von CDK7, pMED1 und CDK12 wurde die klinisch umfangreich charakterisierte HNSCC-Kohorte des Instituts der Pathologie der Universität zu Lübeck verwendet. Untersuchungen an dieser Kohorte führten bereits zu mehreren Publikationen der Arbeitsgruppe (Idel et al., 2020; Klapper et al., 2020; Paulsen et al., 2020; Ribbat-Idel et al., 2021b; Watermann et al., 2021). Die Kohorte umfasst 409 HNSCC-Patienten/-innen mit Gewebeproben aus Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen und Rezidiven (s. Abbildung 1). Die Proben liegen in Form von TMAs vor. Alle Patienten/-innen wurden zwischen 2012 bis 2015 durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein diagnostiziert. Die Behandlung erfolgte durch die Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein. Die klinischen Daten der Patienten/-innen wurden den Krankenakten entnommen (A. Tabelle 12). Vorausgehend wurde ebenfalls für die Tumorgewebeproben von Ribbat-Idel et al. der PD-L1 TPS bestimmt und das Immuninfiltrat charakterisiert. Es wurde unterschieden zwischen drei Immunprofilen. Hot wurden Tumore bezeichnet, welche ein diffuses Immuninfiltrat zwischen den Tumorzellen aufwiesen. Excluded Tumore zeigten Immunzellen vor allem im Tumorstroma und Cold Tumore waren Tumore, die keine bis wenige Immunzellen aufwiesen (Ribbat-Idel et al., 2021b, 2021a).

Für die Evaluation der aDBA wurden vier weitere Kohorten des Instituts ausgewählt, um verschiedene Tumorarchitekturen und Färbungen widerzuspiegeln (s. Tabelle 1). Hierunter befanden sich eine Prostatakarzinomkohorte, eine Endometriumkarzinomkohorte, eine Mundhöhlenkarzinomkohorte (OSCC) und eine Kohorte bestehend aus zufällig ausgewählten Patienten/-innen der oben beschriebenen HNSCC-Kohorte.

Vor der Auswertung wurden alle Stenzen visuell auf Färbeartefakte, Gewebefalten, mangelhafte Qualität des Gewebes und einen zu geringen Tumoranteil hin untersucht und ggf. von der Analyse ausgeschlossen (s. A. Tabelle 13).

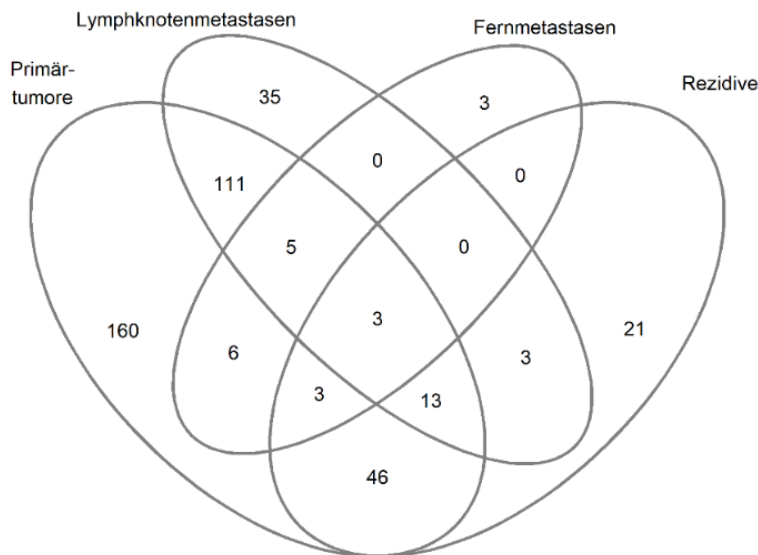


Abbildung 1: Dieses Venn-Diagramm illustriert die Verfügbarkeit und Schnittmengen an verschiedenen Tumorgewebe für die angeführte HNSCC-Kohorte. Aufgrund von fehlender Probenentnahme während des klinischen Aufenthalts bzw. fehlender Progression der Erkrankung war nicht von jedem/jeder Patient/-in Gewebe vom Primärtumor, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen und Rezidiv verfügbar. Die Abbildung zeigt, dass Gewebe von 347 Primärtumoren verfügbar war. Für 65 Patienten/-innen war zusätzlich zum Gewebe des Primärtumors Gewebe vom Rezidiv vorhanden.

Tumorarchitektur	Zellkompartiment	Entität	Antikörper	n
Plattenepithelkarzinom	nukleär	HNSCC	CDK12	108
	zytoplasmatisch	OSCC	IL-6	86
Adenokarzinom	nukleär	Endometriumkarzinome	EVII	106
			Ki-67	106
	zytoplasmatisch	Prostatakarzinome	PSMA	109

Tabelle 1: Übersicht über die Kohorten zur Evaluation der aDBA. Klinische Daten wurden für diese Kohorten nicht benötigt. Die Endometriumkarzinomkohorte wurde sowohl für Ecotropic Viral Integration Site-1 (EVII) als auch für Ki-67 gefärbt. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

2.2 Erstellung der immunhistochemisch gefärbten Objektträger

Die im Institut für Pathologie vorliegenden TMAs wurden mit einem Tissue Arrayer (manueller Tissue Arrayer MTA-1, AlphaMetrix Biotech) erstellt. Aus den FFPE-Gewebeblöcken mit dem Tumorgewebe wurden Stanzen mit einem Durchmesser von 1.2 mm aus den Tumorarealen entnommen und diese in Empfängerblöcke übertragen. Pro Gewebeblock wurden drei Stanzen auf die TMAs übertragen, um die intratumorale Heterogenität besser abzubilden. Anschließend wurden von den Empfängerblöcken 4 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom (Microm HM355S, ThermoScientific) erstellt. In einem 50 °C Wasserbad wurden die Schnitte auf die Objektträger aufgezogen. Anschließend

inkubierten die Objektträger bei 60 °C für eine Stunde in einem Wärmeschrank. Die verwendeten Protokolle für die immunhistochemischen Antikörperfärbungen wurden bereits in vorherigen Projekten der Arbeitsgruppe etabliert. Die Färbungen wurden mit Positivkontrollen gemäß Herstellerangaben etabliert und ggf. austitriert, bis ein adäquates Färbeergebnis vorlag.

Die Färbung erfolgte mit einer vollautomatisierten immunhistochemischen Färbeplattform (*Ventana BenchMark, Roche, Basel, Schweiz*). Im ersten Schritt wurden die Objektträger bei 72 °C mit einer Lösung (*Ventana EZ Prep Concentration (1X), Roche*) über einen Zeitraum von 25 Minuten entparaffiniert. Im zweiten Schritt erfolgte die Proteindemaskierung, um eine ungestörte Bindung der primären Antikörper an die jeweiligen Epitope zu ermöglichen. Die Methylenbrücken zwischen Proteinen, die aufgrund der Formalin-basierten Fixierung entstanden sind, wurden hierzu hydrolysiert, indem die Objektträger für 32 bis 64 Minuten bei 92 °C in einer Pufferlösung (*Ventana Cell Conditioner 1 - CCI, Roche*) (pH 7.8) erhitzt wurden (Shi et al., 1991). Im dritten Schritt wurde die endogene Peroxidase inhibiert, mittels einer 3%igen H₂O₂-Lösung (*Ventana OptiView Peroxidase Inhibitor, Roche*). Es erfolgte eine 4-minütige Inkubation. Dadurch soll ein unspezifischer Umsatz von Chromogen durch endogene Peroxidasen verhindert werden (Radulescu und Boenisch, 2007). Im vierten Schritt erfolgte die Behandlung der Objektträger mit den primären, sekundären und tertiären Antikörpern. Zuerst wurden die primären Antikörper mit Casein-haltiger Lösung (*Ventana Antibody Diluent with Casein, Roche*) entsprechen der Angaben im Anhang (A. Tabelle 14, diese Tabelle enthält auch die Herstellerinformationen) verdünnt. Antikörper, die nicht weiter verdünnt wurden, standen als ready-to-use Präparate in boviner Serumalbumin-haltiger (BSA) Lösung zur Verfügung. Casein bzw. BSA dient der Blockade von unspezifischen Bindungen der Antikörper, um die damit verbundene Hintergrundfärbung zu reduzieren (Buchwalow et al., 2011). Anschließend wurden die Antikörper per Hand pipettiert. Die folgende Inkubation erfolgte je nach primärem Antikörper für 16 bis 48 Minuten bei 37 °C. Danach wurden die Objektträger mit dem sekundären und dem tertiären Antikörper mittels eines Kits behandelt (*Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit, Roche*). Der sekundäre Antikörper (*Ventana HQ Universal Linker, Roche*) ist ein Gemisch aus polyklonalen Antikörpern bestehend aus Ziege-Anti-Maus-IgG, Ziege-Anti-Maus-IgM und Ziege-Anti-Kaninchen, wobei an den Ziegenantikörper ein synthetisches Hapten (Hydroxychinolin-Xylol) gebunden ist. Damit der sekundäre Antikörper an die Fc-Domäne des Primärantikörpers binden kann, wurden die Objektträger nach dem Auftragen des sekundären Antikörpers für 8 Minuten inkubiert. Nach dem Aufbringen des tertiären

Antikörpers (*Ventana OptiView HRP Multimer, Roche*) wurden die Objektträger erneut inkubiert. Der tertiäre Antikörper ist ein monoklonaler HRP-markierter Mausantikörper (Horseradish Peroxidase z. Dt. Meerrettichperoxidase), welcher an das synthetische Hapten des sekundären Antikörpers bindet. Im fünften Schritt erfolgt die eigentliche Färbung. Dazu wurden die Objektträger für 8 Minuten zusammen mit einer 0,2%igen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) Lösung (*OptiView DAB, Roche*) und einer 0,04%igen H₂O₂-Lösung (*Ventana OptiView H2O2, Roche*) inkubiert. In der Reaktion mit H₂O₂ wird das Chromogen DAB oxidiert und es entsteht ein braunes wasserunlösliches Präzipitat. Zum Schluss erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (*Ventana Hematoxylin II, Roche*). Nach Zugabe von Hämatoxylin wurden die Objektträger für 8 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger für 8 Minuten zusammen mit Bluing Reagent (*Ventana Bluing Reagent, Roche*) inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten des automatisierten Protokolls erfolgten jeweils Waschschrte mit einer Pufferlösung (*Ventana Reaction Buffer Concentrate (IX), Roche*) (pH 7.6). Um die Objektträger während den einzelnen Inkubationen vor Austrocknung zu schützen, wurde ein Öl (*Ventana ULTRA LCS (Predilute), Roche*) verwendet. Dieses Öl verteilt sich auf der Oberfläche der wässrigen Lösung über dem Objektträger und bildet so eine Barriere, die für wasserlösliche Substanzen durchlässig ist. Die Antikörperlösungen konnten so weiterhin auf die Objektträger bzw. die Gewebeschnitte aufgetragen werden. Die fertig gefärbten Objektträger durchliefen im Anschluss eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, Isopropanol, Xylol, jeweils für 10 Sekunden) zur Entwässerung der Schnitte. Danach wurden die Deckgläschen aufgebracht. Dieser Schritt erfolgte mit einem automatischen Glaseindeckautomat (*Leica CV 5030, Leica Biosystems*) und einem Eindeckmedium (*Pertex, Avantor*).

2.3 Digitalisierung

Die Objektträger wurden mit einem Ventana iScan HT Scanner (*Ventana, Tucson, USA*) digitalisiert. Die folgende computergestützte Auswertung erfolgte zum einen mit der käuflich erwerbbaen Bildauswertungssoftware Definiens Tissue Studio (*Definiens Developer XD 2.0, Definiens AG, München, Deutschland*) und zum anderen mit der Freeware QuPath (*Version 0.2.3*) (Bankhead et al., 2017).

Mittels Definiens Tissue Studio wurden die Bilddateien als .bif-Dateien in das Programm eingelesen und anschließend per mDBA ausgewertet. Die Daten Erhebung erfolgte auf einem Windows 7 basierten Computer mit einem 24" Bildschirm und einer Auflösung von 1920 × 1080 px.

Für die Auswertung mit QuPath wurde das Dateiformat .tif verwendet. Die anschließende Auswertung erfolgte per aDBA an einem Computer mit Windows 10 Betriebssystem und einem 12.3” Monitor mit einer Auflösung von 2736×1824 px.

2.4 Auswertung

2.4.1 Manuelle digitale Bildanalyse

Für die mDBA wurden zuerst die einzelnen Stenzen der TMAs einer Position im Raster des Programms zugewiesen. Im Anschluss wurden repräsentativ Tumorzellareale zeitaufwendig manuell markiert. Die so entstandenen Areale werden als ROIs bezeichnet. Das Programm führte innerhalb dieser Bereiche eine Zelldetektion durch. Im Anschluss wurden zellbasierte Messwerte im Nukleus und Zytoplasma zur Farbeintensität der DAB-Färbung (im Folgenden CI genannt) erhoben und ein Durchschnittswert pro Stanze berechnet. Die Messwerte zur CI sind numerisch und ohne Angabe von Einheiten. Darüber hinaus wurden die Zellen mittels manuell festgelegter Schwellenwerte für die CI als negativ, schwach, mittel und stark gefärbt klassifiziert und die Anteile je Stanze berechnet, woraus sich auch der PI ermittelte.

2.4.2 Automatisierte digitale Bildanalyse

Für die aDBA wurden analog zuerst die Stenzen ihren Positionen zugewiesen. Im Anschluss wurden die Farbvektoren der Färbung identifiziert für die spätere CI-Messung (s. Color Deconvolution) und es wurde eine Zelldetektion durchgeführt, wobei die Parameter für die verschiedenen Tumore und Färbungen visuell optimiert wurden. Automatisch nach der Zelldetektion erhebt die aDBA zellbasierte Messwerte zu Zellfläche, -form und -färbung. Es wurden zusätzlich für alle Zellen sog. smoothed features im Umkreis von 25 μ m berechnet, um die Anzahl an Variablen für den ML-Algorithmus zu erhöhen, was die Klassifikation unterstützt (Acs et al., 2019).

Im Gegensatz zur mDBA erfolgt die Erkennung der ROI bei der aDBA automatisiert durch Random Forest (RF) Klassifikation der Zellen. Zur Erstellung des RF wurden Trainingsdatensätze von klassifizierten Zellen der Klassen „tumor“, „stroma“, „immune“, und „other“ genutzt. Insbesondere bei limitierten Datensätzen liefern Random Forest Modelle gute Ergebnisse (Sarica et al., 2017; Viratham Pulsawatdi et al., 2020). Die Voreinstellungen für die Hyperparameter wurden beibehalten (verfügbare Variablen = alle ($n = 82$); maximale Tree Tiefe: unbegrenzt; minimale Anzahl an Objekten pro Teildatenmenge: 10; maximale Anzahl an Trees: 50; Stoppkriterium Genauigkeit:

ausgeschaltet) (Martino et al., 2020). Die Ergebnisse der Zellklassifikation des RF wurden visuell kontrolliert (Loughrey et al., 2018).

Um Durchschnittswerte für die CI der als „tumor“ klassifizierten Zellen, je Stanze zu erhalten, wurde ein groovy-Skript geschrieben, da diese Auswertung standardmäßig nicht von der Software unterstützt wird (s. A. Abbildung 19). Anschließend erfolgte analog zur mDBA eine Einteilung der Zellen in die Gruppen negativ, schwach, mittel und stark basierend auf CI-Schwellenwerten zur Erhebung des PI.

2.4.2.1 Color Deconvolution

Der Vorteil der IHC im Gegensatz zu anderen Verfahren wie dem Western Blot ist, dass räumliche Information zur Expression eines oder mehrerer Zielantigene gewonnen werden (Helps et al., 2012). Allerdings muss diese Expression quantifiziert werden. Problematischer Weise ist die Färbung eines Pixels in einem IHC-Bild immer eine Mischung der Farben, die zur Färbung genutzt wurden (z.B. Hämatoxylin, Eosin und DAB). Ruifrok und Johnston entwickelten ein mathematisches Modell zur Trennung der Färbungen, sodass die optische Dichte (OD) der DAB-Färbung eines Pixels als Surrogatparameter für die dortige Antigenexpression bestimmt werden kann (Ruifrok und Johnston, 2001). Die Grundzüge dieses Modells werden im Folgenden erläutert.

Es wird davon ausgegangen, dass sich die IHC-Färbungen entsprechend des Lambert-Beer'schen Gesetzes verhalten. Die Intensität einer Farbe im Bild hängt ab von der Menge der Färbung A und den spezifischen Absorptionsfaktoren c für die Rot-Grün-Blau-Farbkanäle (RGB). Es wird deutlich, dass zwischen Färbeintensität und Menge der Färbung ein nicht-linearer Zusammenhang besteht.

$$I_C = I_{0,C} \exp(-A c_C)$$

Jedoch besteht ein linearer Zusammenhang zwischen optischer Dichte (OD) und Konzentration der Färbung. Daher eignet sich die OD dafür eine Auftrennung der Farben vorzunehmen.

$$OD_C = -\log_{10}(I_C/I_{0,C}) = A * c_C$$

Stellt man sich den Farbraum als Vektorraum vor, so kann dieser zu der Basis der OD der RGB Farbvektoren B_{OD-RGB} dargestellt werden oder zu der Basis der OD von Hämatoxylin, Eosin und DAB (HED) B_{OD-HED} . Über eine Basistransformation lässt sich ein Farbvektor, der zu B_{OD-RGB} ausgedrückt ist und im Bild direkt bestimmt werden kann, auch zu B_{OD-HED} ausdrücken. Dieser Basiswechsel erfolgt mithilfe einer Basiswechselmatrix. Anstatt wie

vorher enthält ein Farbvektor nun nicht die OD Information zu den Grundfarben RGB, sondern die OD-Information zu den Farben HED. Um einen Basiswechsel durchzuführen, müssen die Basisvektoren der neuen Basis ausgedrückt zur alten Basis bekannt sein. In diesem Fall die OD-Farbvektoren von Hämatoxylin, Eosin und DAB. In der Gleichung

$$C = D [y]$$

aus dem Modell von Ruifrok und Johnston beschreibt y einen OD-Farbvektor zu B_{OD-RGB} , D beschreibt die Basiswechselmatrix und daraus resultierend stellt C den Vektor y zu B_{OD-HED} dar. Diesem Vektor sind die Information zur OD von HED zu entnehmen, welche wie eingangs erwähnt die Konzentrationen der Färbungen widerspiegeln (Ruifrok und Johnston, 2001).

2.4.2.2 *Random Forest*

Ziel der aDBA ist eine Zeitersparnis, indem die Klassifikation der Zellen von einem ML-Algorithmus durchgeführt wird. Hierfür eignet sich das Klassifikationsverfahren RF. Nachfolgend wird kurz auf die wesentlichen Merkmale eines RF eingegangen.

Die Grundeinheit des RF ist ein Decision Tree (DT) (Ali et al., 2012). Man stelle sich einen tabellarischen Datensatz mit verschiedenen Variablen und mehreren Beobachtungen vor (s. Tabelle 2). Eine dieser Variablen weist den Beobachtungen eine Kategorie zu. Ein DT wird erstellt, indem die Beobachtungen des Datensatzes sequenziell in Teilmengen aufgeteilt werden. Jede Aufteilung der Beobachtungen erfolgt anhand von Eigenschaften in Bezug auf eine Variabel. Die Reihenfolge, in der die Variablen im DT gewählt werden, bestimmt sich über die Berechnung des Gini Index (Daniya et al., 2020).

Der Gini Index ist ein Maß für die Unreinheit der resultierenden Teilmengen. Ziel ist es am Ende Teilmengen zu erhalten, die möglichst nur Beobachtungen einer bestimmten Kategorie enthalten. Es werden alle Variablen des Datensatzes auf ihre Reduktion des Gini Index hin überprüft und die Eigenschaft ausgewählt, welche diesen am stärksten reduziert (s. Abbildung 2). Dieser Prozess wird so lange auf alle Teilmengen angewendet, bis ein definiertes Stoppkriterium greift, z.B. wenn der DT eine bestimmte Tiefe erreicht hat (Daniya et al., 2020; Tangirala, 2020) (s. Abbildung 3).

Ein RF besteht nun aus vielen DTs, die durch Ziehung von Bootstrap-Stichproben aus dem Ursprungsdatensatz erstellt werden. Zwei Hyperparameter sind entscheidend für ein RF. Zum einen die Anzahl von DTs die der RF enthalten soll. Zum anderen der mtry-Wert. Er gibt die Anzahl an zufällig ausgewählten Variablen wieder, die pro Aufteilung des DTs zur

Reduktion des Gini Index in Betracht gezogen werden. Zusammen mit dem Bootstrapping führt diese Zufälligkeit zu einer Diversifizierung der DTs (Ali et al., 2012; Han et al., 2020). Soll nun eine Beobachtung unbekannter Kategorie einer Kategorie zugeordnet werden, wird diese von allen DTs des RF klassifiziert, die am häufigsten votierte Kategorie, ist die resultierende Kategorie für die Beobachtung (Ali et al., 2012; Sarica et al., 2017).

$$1 \quad p_i = \frac{n_i}{n}$$

$$2 \quad \text{Gini Index} = 1 - \sum_{i=1}^c (p_i)^2$$

$$3 \quad w_j = \frac{n_j}{n}$$

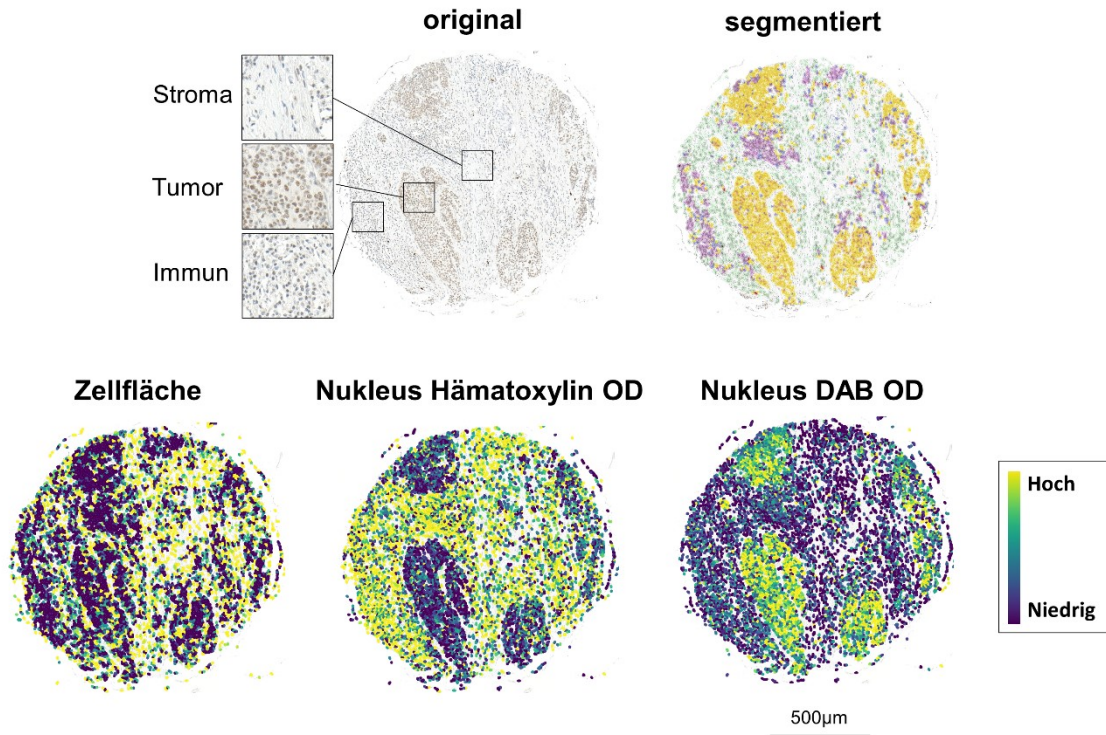
$$4 \quad \text{gewichteter Gini Index} = \sum_{j=1}^c w_j * \text{Gini Index}_j$$

Abbildung 2: Berechnung des Gini Index, 1) p_i ist die Wahrscheinlichkeit für ein Objekt in einer Menge n der Kategorie i zugeordnet zu werden. Der Gini Index berechnet sich entsprechend 2). Nach Aufteilung der Ursprungsmenge muss der gewichtete Gini Index berechnet werden, um die Reduktion des Gini Index zu überprüfen. 3) Zur Berechnung des gewichteten Gini Index wird das Gewicht der Teilmenge w_j benötigt, dieses berechnet sich als Quotient von den Beobachtungen in der Teilmenge hier n_j und allen Beobachtungen n . 4) Anschließend wird für jede Teilmengen j das Gewicht der Teilmenge mit dem Gini Index der Teilmenge multipliziert und für alle Teilmengen summiert (Daniya et al., 2020).

Kategorie	Zellfläche in μm^2	Nukleus Hämatoxylin OD	Nukleus DAB OD
Immun	90.75	0.335	0.018
Tumor	146.75	0.180	0.305
Tumor	184.25	0.204	0.285
Stroma	130.50	0.178	0.087

Tabelle 2: Ausschnitt aus dem Beispieldatensatz zur Erstellung des DT in Abbildung 3 b). Jede Zeile repräsentiert die Messwerte einer Zelle. Es wurden Messwerte in Bezug auf Zellfläche, Hämatoxylin- und DAB-Färbung von 1802 Zellen erhoben und zur Erstellung des DT genutzt.

a)



b)

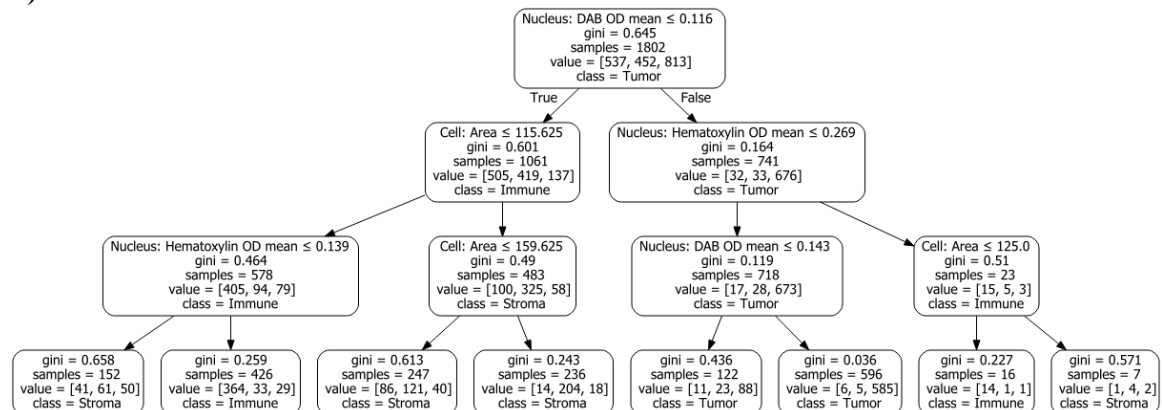


Abbildung 3: a) Illustration der Anwendbarkeit eines RF auf histologische Bilddaten. Die obere Reihe zeigt das Originalbild einer gegen CDK12 gefärbten Stanze mit exemplarisch vergrößerten Regionen von Tumorzellen, Stromazellen und Immunzellen. Rechts davon die durch RF segmentierte Stanze, die Farben repräsentieren die Klassifikation der Zellen (Tumor = gelb, Immun = lila, Stroma = grün). Die unteren Aufnahmen zeigen zellbasierte Heatmaps zu verschiedenen Messwerten, wobei generell hohe Werte grün bis gelb dargestellt werden und niedrige Werte türkis bis lila. Durch den optischen Kontrast im Bild wird deutlich, dass sich die Areale der Tumorzellen vor allen durch ihre Hämatoxylin-OD und DAB-OD von den Stroma- und Immunzellen unterscheiden. **b)** DT erstellt aus der Beispieldatenmenge aus Tabelle 2. In den einzelnen Feldern sind Angaben zum Gini Index, der Größe der (Teil-)Datenmengen, der Häufigkeitsverteilung der Kategorien und der häufigsten Kategorien zu entnehmen. Vergleicht man die erste Aufteilung im DT mit den Bilddaten aus a), fällt auf, dass in den ersten beiden Aufteilungen „Nucleus DAB OD mean ≤ 0.116 “ und „Nucleus Hematoxylin OD mean ≤ 0.269 “ als Variablen verwendet werden, um die Tumorzellen von den anderen Zellen zu unterscheiden. Diese beiden Attribute beinhalten einen hohen Informationsgewinn für die Klassifizierung von Zellen in diesem Beispiel, was sich auch optisch in a) bestätigen ließ. Betrachtet man den gesamten DT so wird deutlich, dass die gewichteten Gini Indizes und Unreinheit über die Tiefe des DT sinken.

2.5 Vergleich von manueller und automatisierter digitaler Bildanalyse

2.5.1 Zelldetektion

Definiens Tissue Studio und QuPath führen eine Zelldetektion durch, um im Anschluss die CI in verschiedenen Zellkompartimenten zu bestimmen. Um die Ergebnisse der Zelldetektion zwischen den beiden Programmen zu vergleichen, wurden identische Gewebeareale in der gegen CDK12 gefärbten HNSCC-Kohorte mit beiden Programmen annotiert und eine Zelldetektion durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen in diesen Arealen per Hand ausgezählt. Im Anschluss wurden die Ergebnisse verglichen.

2.5.2 Farbeintensitätsbestimmung

Zum Vergleich der Messungen der CI wurde mit mDBA und aDBA jeweils die ROI markiert und dazu vorgegangen wie in den Abschnitten Manuelle bzw. Automatisierte digitale Bildanalyse beschrieben. Es wurden Stanzen-basierte Durchschnittswerte für die CI mit beiden Verfahren ermittelt. Da zu jedem/jeder Patient/-in drei Stanzen vorlagen, wurde ein Durchschnittswert der CI pro Patiententriplett gebildet. Anschließend wurden die Ergebnisse von mDBA und aDBA verglichen.

Im Folgenden diente mDBA als Goldstandard aus zwei Gründen. Erstens wurde mDBA schon für viele Forschungsprojekte vom Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck genutzt, die schon zu zahlreichen Publikationen geführt haben (Braun et al., 2013; Idel et al., 2020; Klapper et al., 2020; Paulsen et al., 2020). Zweitens setzt die mDBA voraus, dass der/die Nutzer/-in manuell die ROI markiert. Das Verfahren unterliegt somit direkter visueller Kontrolle.

Analog zu vorherigen Studien wurde davon ausgegangen, dass eine starke Korrelation von mDBA und aDBA Messwerten in Bezug auf die CI auf eine ausreichende ROI Erkennung durch aDBA schließen lässt (Rizzardi et al., 2012). Die Messwerte für die CI dienten so als Surrogatmarker für die ROI Erkennung (s. Abbildung 4).

Um eine generalisierte Aussage für verschiedene Anwendungsbereiche in der histologischen Bildanalyse treffen zu können und mögliche Verzerrungen des Ergebnisses aufgrund von Gewebsarchitektur oder zellulärem Kompartiment auszuschließen, wurden vier separate Analysen durchgeführt: zytoplasmatische und nukleäre IHC-Färbungen jeweils in Adeno- und Plattenepithelkarzinomen. Im Anschluss wurden die Messwerte der CI in den entsprechenden Kompartimenten zwischen den Verfahren korreliert.

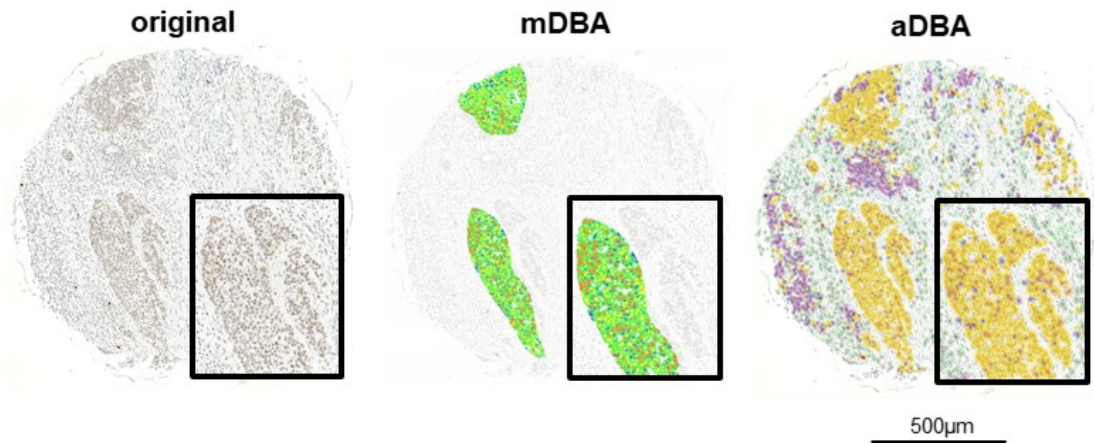


Abbildung 4: Links eine Stanze von einem TMA. Rechts davon die selbe Stanze mit markierter ROI via mDBA und aDBA. Während in mDBA nur die Zellen detektiert worden sind, welche in der exemplarisch markierten ROI lagen, wurden in der aDBA alle Zellen detektiert und die Tumorzellen über einen RF Algorithmus klassifiziert. Nur diese gingen in die spätere Analyse ein. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

2.5.3 Vergleich des Positivindexes

Zur Bestimmung des PI wurde basierend auf der Färbung ein Schwellenwert festgelegt und Zellen entsprechend als positiv oder negativ klassifiziert. Für diesen Vergleich wurde die gegen das Antigen Ki-67 IHC gefärbte Endometriumkarzinomkohorte verwendet. In beiden Programmen muss der/die Nutzer/-in manuell die Schwellenwerte für negativ, schwach, mittel und stark positiv gefärbte Zellen festlegen, wobei nur der Schwellenwert zwischen negativ und schwach positiv gefärbten Zellen für diese Auswertung von Relevanz ist. Für den Vergleich wurden die Schwellenwerte zwischen beiden Programmen visuell kalibriert, sodass dieselben Zellen in beiden Programmen übereinstimmend als negativ oder positiv klassifiziert wurden. Die Ergebnisse wurden anschließend verglichen.

2.5.4 Vergleich der Bearbeitungsdauer

Die Dauer der Analyse je Kohorte wurde gemessen als Zeit, die aktiv vor dem Bildschirm gearbeitet wurde. Diese Zeitspanne umfasste in beiden Programmen die Zuordnung der Stanzen zu den entsprechenden Patienten/-innen, inklusive der Zeit zum Markieren der ROIs in mDBA bzw. der Erstellung des RF-Modells in der aDBA. Zeitspannen, in denen der Computer die Berechnungen durchführte, flossen nicht in die Auswertung ein. Alle Arbeitsabläufe wurden vor der Zeiterfassung etabliert, sodass etwaige Optimierungsprozesse nicht bei der Analyse berücksichtigt wurden. Anschließend wurde die Bearbeitungsdauer verglichen.

2.6 Statistik

Für die Statistik und die Erstellung der Grafiken wurde R (verfügbar unter *R Foundation, Wien, Österreich, Version 4.0.2* <http://www.R-project.org>, letzter Aufruf 15.01.2022) verwendet. In R wurden die Libraries, readxl, tidyverse, dplyr, für Arbeiten mit Tabellen genutzt und survival, survminer, finalfit für die Überlebensanalysen sowie ggplot2, ggpubr, ggsci, ggVennDiagram, blandr, DescTools, pROC, Rcpp, pwr, arsenal zur Erstellung von Abbildungen und für statistische Verfahren, für die Poweranalyse wurden zusätzlich Stichprobengrößenrechner eingesetzt (verfügbar unter <https://homepage.univie.ac.at/robin.ristl/samplesize.php?test=logrank> und https://www.statskingdom.com/sample_size_all.html, letzter Aufruf 15.01.2022). Die Abbildung des DT wurde mittels Python (verfügbar unter *Python Software Foundation, Version 3.8* <http://www.python.org>, letzter Aufruf 15.01.2022) und den Libraries sklearn und graphviz erstellt.

Von den Triplets der Patient/-innen wurde für die Messwerte zur CI und PI jeweils das arithmetische Mittel berechnet, um die intratumorale Heterogenität besser abzubilden. Dieser Wert wurde für die statistischen Analysen verwendet. Für die statistische Auswertung wurde sich an den Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) orientiert (McShane et al., 2005).

Poweranalysen wurden durchgeführt und eine Power von 80 % festgelegt. Die zu erwartenden Effektstärken wurden aus der verfügbaren Literatur abgeleitet (s. entsprechende Quellen in der Einleitung) (s. A. Tabelle 15). Alle Hypothesen wurden zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ wurde festgelegt.

Als Maß für die Korrelation wurde in dieser Studie der Pearson Korrelationskoeffizient (PKK) berechnet, um den linearen Zusammenhang der Expression von CDK7 und pMED1 in verschiedenen Tumorgeweben zu bestimmen, sowie die Messwerte von mDBA und aDBA zu korrelieren. In dem Zusammenhang wurden lineare Regressionen durchgeführt und die 95%-Prädiktionsintervalle (95%-PI) berechnet (Bland und Altman, 2003). Ebenfalls wurde eine lineare Regression durchgeführt, um das Verhältnis der Einheiten für die CI von mDBA und aDBA zueinander zu bestimmen. Zur Evaluation der Übereinstimmung des PI und der Zelldetektion zwischen mDBA und aDBA wurden aus den Differenzen und Mittelwerten der Messwertpaare Bland-Altman-Diagramme erstellt (Bland und Altman, 1999, 2003; Abu-Arafah et al., 2016) und es wurde Lin's Koeffizient der Übereinstimmung

(LKK) berechnet. Für den Vergleich der Auswertungszeit mittels mDBA und aDBA wurde ein Wilcoxon-Rangsummentest verwendet.

Für die Vergleiche zwischen der CDK7-Expression zwischen verschiedenen klinischen Gruppen wurden t-Tests angewendet, die Bedingungen für die Anwendung der t-Tests wurden vorher überprüft. Beim Vergleich der CDK7-Expression zwischen den unterschiedlichen Tumorlokalisationen, -geweben und -immunprofilen wurden einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Karzinome unbekannter Herkunft wurden aufgrund der geringen Fallzahl von der Auswertung die Tumorlokalisation betreffend ausgeschlossen. Für die analogen Vergleiche der pMED1- und CDK12-Expression wurden nicht-parametrische Tests genutzt, da die Bedingungen für t-Tests bzw. ANOVA nicht erfüllt waren. Vergleiche zweier Gruppen wurden mittels Wilcoxon-Rangsummentests durchgeführt, folglich wurden mehrerer Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Tests verglichen. Für alle post-hoc-Tests, wurde der p-Wert entsprechend der Benjamini-Hochberg-Prozedur adjustiert. Der Vergleich von CDK12-Expression in Primärtumoren und Rezidiven erfolgte zusätzlich über den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Für die grafische Darstellung der Expression verschiedener Gruppen wurden Boxplots gewählt, welche den Median, den Interquartilabstand (IQR), das Minimum und Maximum sowie Ausreißer anzeigen, zusätzlich sind die einzelnen Messwerte als Punkte abgebildet worden, um einen Eindruck über die Verteilung zu geben.

Für die Überlebensanalysen wurde die Kohorte entsprechend der medianen Expressionen stratifiziert. Die Einteilung nach CDK12-Expression erfolgte gesondert über Erstellung einer Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve und Bestimmung des optimalen Schwellenwerts in Bezug auf den definierten Endpunkt. Dieser Schwellenwert wurde über den Youden-Index bestimmt. Zusätzlich wurde die Area under the ROC-Kurve (AUROC) bestimmt. Das 5-Jahres-Überleben (5-JÜ) wurde definiert als Zeitraum zwischen Erstdiagnose und Tod beliebiger Ursache. Für das 5-Jahres-krankheitsfreie-Überleben (5-JKÜ) wurden als Endpunkte das Auftreten eines Lokal-, Regional- oder Fernrezidivs oder Tod durch beliebige Ursache festgelegt (Bonnetain et al., 2014). Überlebenskurven wurden als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und die Gruppen mittels Log-Rank-Test verglichen. Patienten/-innen, die in der Nachbeobachtung verloren gegangen sind, wurden entsprechend zensiert und durch einen Strich markiert. Die Unterschiede in Bezug auf die verschiedenen klinischen Merkmale der im Log-Rank-Test untersuchten Gruppen wurden mittels Chi-Quadrat-Test verglichen (s. A. Tabelle 16). Weiter wurden die Hazard Ratios (HR) und 95%-Konfidenzintervalle (95%-KI) der Zielvariabel mittels Cox-Regression bestimmt und in der

multivariablen Cox-Regression auf Interaktionen mit den Kovariaten Alter, Alkohol- und Nikotinkonsum, p16-Status, UICC-Stadium und Grading hin untersucht.

Generell wurden Patienten/-innen bei den einzelnen Auswertungen von der Analyse ausgeschlossen, wenn Angaben zur Proteinexpression fehlten, da die Stenzen aufgrund von Artefakten oder mangelnder Qualität nicht ausgewertet werden konnten, oder klinische Angaben, die entsprechende Auswertung betreffend, nicht verfügbar waren.

2.7 Votum der Ethikkommission

Die vorliegende Studie wurde vom Ethik-Komitee der Universität zu Lübeck genehmigt und entsprechend den Grundsätzen der Erklärung von Helsinki durchgeführt. Die entsprechenden Projekt Codes finden sich im Folgenden: Projektcode AZ 16-277, Datum der Genehmigung 18.11.2016; Projektcode 19-082A, Datum der Genehmigung 10.01.2020; Projektcode 16-272A, Datum der Genehmigung 06.04.2017; Projektcode 18-053, Datum der Genehmigung 02.03.2018, Datum der Ergänzung: 17.06.2020.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich von manueller und automatischer digitaler Bildanalyse

3.1.1 Zelldetektion

Für den Vergleich von mDBA und aDBA wurde zuerst überprüft, ob unterschiedliche Ergebnisse bei der Zelldetektion als möglicher Bias der Auswertung in Betracht kommen. Da die Zelldetektion in beiden Programmen analog abläuft ohne Nutzung von ML-Algorithmen, wird an dieser Stelle von Definiens Tissue Studio und QuPath gesprochen.

Es wurden die Anzahl der detektierten Zellen in 30 definierten und annotierten Gewebearealen zwischen den Programmen verglichen (s. Abbildung 5 a)). In diesen Arealen wurden die Zellen zusätzlich visuell ausgezählt. Untersuchungskohorte war die gegen das Protein CDK12 immunhistochemisch gefärbte HNSCC-Kohorte.

Rein visuell wurden in den Gewebearealen durchschnittlich 66 Zellen gezählt mit einer Standardabweichung (SD) von 26 und einer Spannweite von 29-130. Die Anzahl der detektierten Zellen unter Nutzung von Software lag höher und betrug hier durchschnittlich pro Areal 71 (SD 30) für Definiens Tissue Studio und 70 (SD 30) für QuPath. Es wurden der PKK und der LKK berechnet. Zwischen allen Modalitäten zeigte sich eine starke Korrelation und Übereinstimmung ($r > 0.9$, $p < 0.001$; $LKK > 0.9$). Zwischen den beiden Programmen wurde der PKK mit 0.97 (95%-KI: 0.93-0.98, $p < 0.001$) und der LKK mit 0.96 (95%-KI: 0.93-0.98) bestimmt (s. Tabelle 3). Die erstellten Bland-Altman-Diagramme zeigten eine durchschnittliche Abweichung zwischen den Programmen von einer Zelle, d.h. Definiens Tissue Studio detektierte pro Areal durchschnittlich eine zusätzliche Zelle. Die 95%-Limits of Agreement (95%-LoA) wurden bestimmt und betrugen 31 Zellen (s. Abbildung 5 b)).

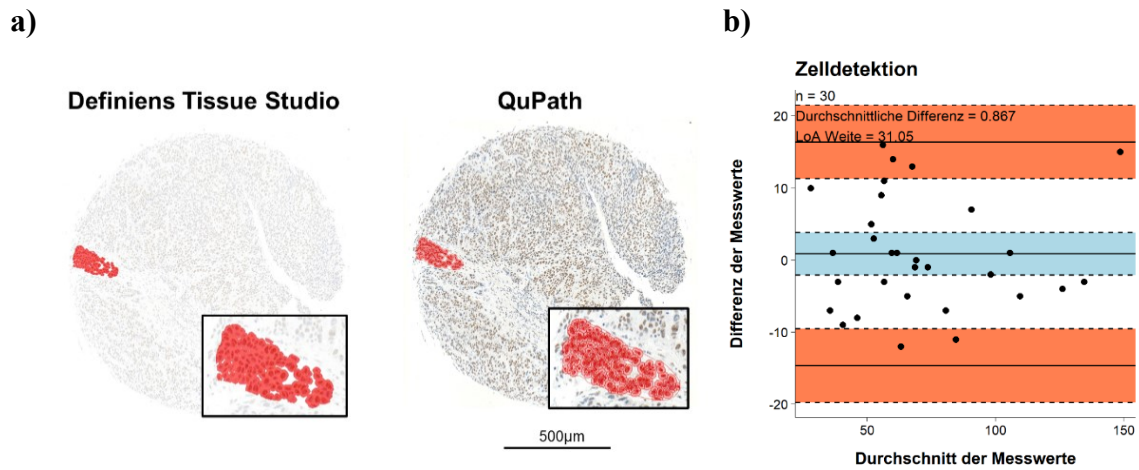


Abbildung 5: **a)** Beispielhafte Aufnahmen einer Stanze in Definiens Tissue Studio und QuPath. In beiden Programmen wurde das selbe Zellareal markiert und eine Zelldetektion durchgeführt. Die Anzahl der detektierten Zellen wurde in 30 solcher Areale bestimmt und zwischen den beiden Programmen verglichen und mit der visuell erhobenen Anzahl an Zellen pro Areal verglichen. **b)** Bland-Altman-Diagramm als grafische Darstellung der Übereinstimmung der Zelldetektion von QuPath und Definiens Tissue Studio. Das blaue Areal illustriert das 95%-KI der mittleren Abweichung der Messwerte, welche durch die darin enthaltene durchgezogene Linie dargestellt wird. Entsprechend stellen die orange markierten Areale das 95%-KI des unteren bzw. oberen 95%-LoA dar. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

Modalitäten	n	r	95%-KI	p	LKK	95%-KI
Visuell u. Definiens Tissue Studio	30	0.94	0.88-0.97	< 0.001	0.92	0.85-0.96
Visuell u. QuPath	30	0.97	0.95-0.99	< 0.001	0.97	0.94-0.98
Definiens Tissue Studio u. QuPath	30	0.97	0.93-0.98	< 0.001	0.96	0.93-0.98

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Korrelationen nach Zelldetektion mit Definiens Tissue Studio, QuPath und der visuellen Auszählung. Alle Modalitäten wiesen eine hohe Korrelation auf. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

3.1.2 Färbeintensitätsbestimmung

Die IHC-Färbungen von CDK12 und Ecotropic Viral Integration Site-1 (EVI1) als nukleäre Marker sowie Interleukin-6 (IL-6) und prostataspezifischen Membranantigen (PSMA) als zytoplasmatische Marker, zeigten innerhalb einer Stanze ein homogenes Färbemuster mit geringer Variabilität in der CI zwischen den Zellen. Beim Vergleich verschiedener Patienten/-innentriplets zeigte sich ein Spektrum der CIs. Lediglich die IL-6 Kohorte bildete hier eine Ausnahme. Hier wiesen die Stenzen im Allgemeinen eine recht starke Färbung auf (s. Abbildung 6).

Definiens Tissue Studio und QuPath geben die CI in unterschiedlicher Einheit wieder. QuPath misst die OD der DAB-Färbung als Maß für die CI. Definiens Tissue Studio tut dies ohne Angabe einer Einheit. Um die Relation dieser Messwerte zu überprüfen, wurden einzelne Zellen verschiedener CI in der gegen Ki-67 gefärbten Endometriumkarzinomkohorte ($n = 5$) in beiden Programmen markiert. Die erhobene CI der Zellen wurde korreliert sowie eine lineare Regression durchgeführt. Der PKK zeigte eine starke lineare Abhängigkeit der Messwerte ($r = 0.99$, $p < 0.001$). Der Steigungskoeffizient der linearen Regressionsanalyse betrug 1.37 (95%-KI: 1.30-1.45). Der Schnittpunkt mit der y-Achse lag bei -0.02 (95%-KI: -0.06-0.02).

Bei der Korrelation der Messwerte von mDBA und aDBA unter den Kohorten lag der PKK zwischen 0.938-0.995 ($p < 0.001$) (s. Tabelle 4 a)). Da die Messwerte der beiden Programme zwar einen linearen Zusammenhang zeigten, jedoch nicht eins-zu-eins austauschbar waren, wurden lineare Regressionen durchgeführt und die 95%-PI berechnet, um ein vergleichbares Maß zu den 95%-LoA eines Bland-Altman-Diagramms zu erhalten, wie von J. M. Bland und D. G. Altman vorgeschlagen (Bland und Altman, 2003) (s. Abbildung 7). Die durchschnittlichen Breiten der 95%-PI reichten von 0.065-0.193. Das schmalste 95%-PI zeigte sich für die gegen IL-6 gefärbte OSCC-Kohorte, das weiteste für die gegen EVI1 gefärbte Endometriumkarzinomkohorte. Die Steigungskoeffizienten für die lineare Regression reichten von 0.64-0.90. In absoluten Zahlen waren die Stanzen-basierten Messwerte der CI für Messungen via mDBA höher als Messungen mit aDBA (s. Tabelle 4 b)).

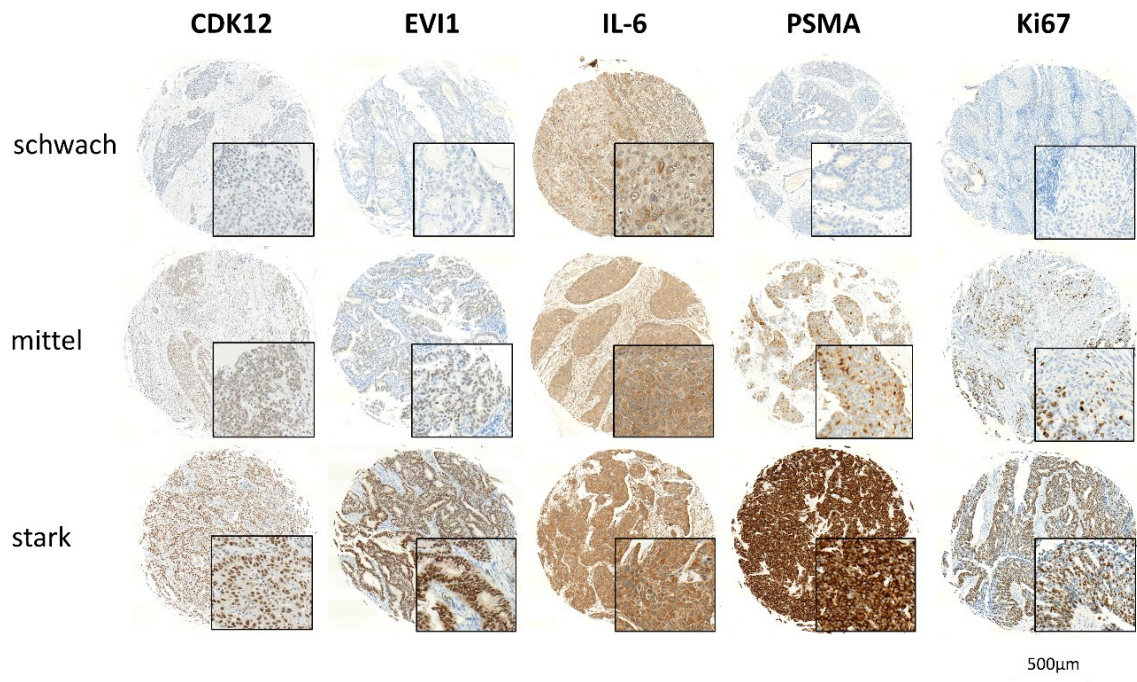
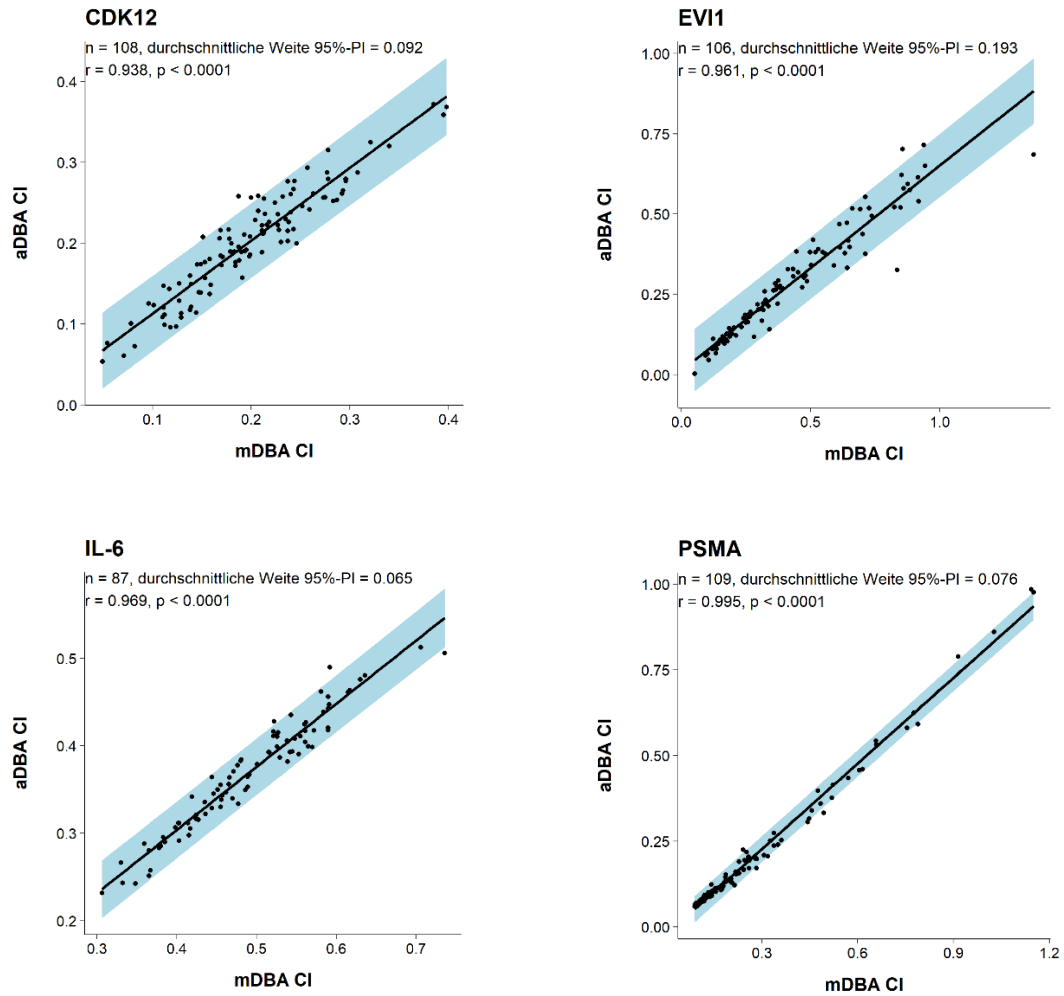


Abbildung 6: Exemplarische Stanzen von den Färbungen, welche für den Vergleich von mDBA und aDBA genutzt worden sind. Generell zeigte sich ein homogenes Färbemuster innerhalb der einzelnen Stanzen, die von einem/einer Patienten/-in stammten. Zwischen den Gewebeproben der verschiedenen Patienten/-innen gab es große Unterschiede in der Intensität der Antikörperfärbung. Von diesen Beobachtungen gab es zwei Ausnahmen. Zum einen zeigte die IL-6 gefärbte OSCC-Kohorte durchweg eine recht starke Färbung, zum anderen gab es in der Ki-67 gefärbten Endometriumkarzinomkohorte für diesen Antikörper erwartbare deutliche intratumorale Unterschiede in der Färbung einzelner Zellen. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

a)



b)

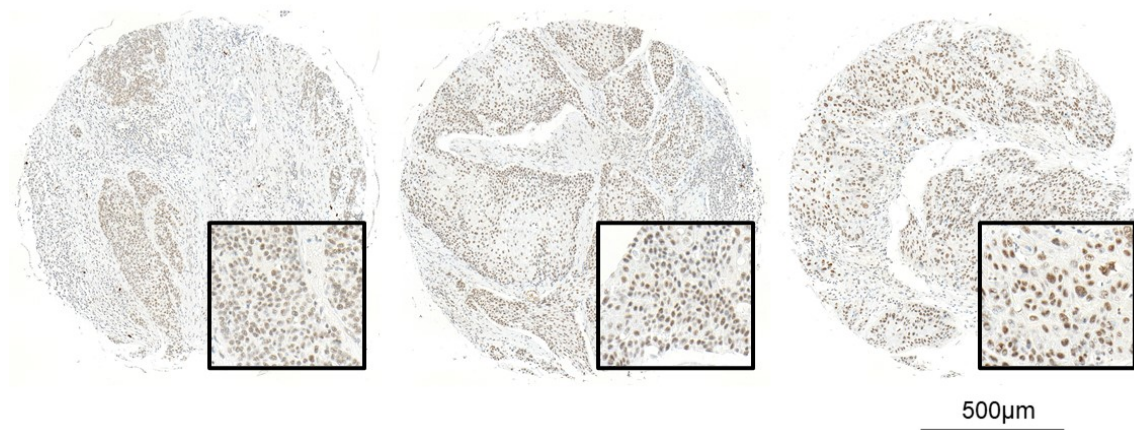


Abbildung 7: a) Streudiagramme zur Illustration für mDBA und aDBA Messungen der CI, zusätzlich ist eine lineare Trendlinie mit in blau umgebenden 95%-PI dargestellt. Für alle Kohorten konnte eine starke Korrelation der beiden Messwerte nachgewiesen werden. b) Stenzen aus der gegen CDK12 gefärbten HNSCC-Kohorte zur Illustration des 95%-PI: mittig eine Referenzstanze, links davon eine Stanze die die untere Grenze des 95%-PI darstellt, rechts davon entsprechend eine Stanze an der oberen Grenze. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

a)

Zellkompartiment/Tumorarchitektur	Antikörper	n	r	95%-KI	p
Nukleär/Plattenepithel	CDK12	108	0.938	0.911-0.967	< 0.001
Nukleär/Adenokarzinom	EVII	106	0.961	0.943-0.973	< 0.001
Zytoplasmatisch/Plattenepithel	IL-6	87	0.969	0.952-0.979	< 0.001
Zytoplasmatisch/Adenokarzinom	PSMA	109	0.995	0.992-0.996	< 0.001

b)

Zellkompartiment/Tumorarchitektur	Antikörper	n	Steigungskoeffizient für mDBA	Schnittpunkt	R2	Durchschnittliche Weite des 95%-PI
Nukleär/Plattenepithel	CDK12	108	0.90 (0.84-0.97)	0.02 (0.01-0.03)	0.88	0.092
Nukleär/Adenokarzinom	EVII	106	0.64 (0.6-0.67)	0.01 (-0.01-0.03)	0.92	0.193
Zytoplasmatisch/Plattenepithel	IL-6	87	0.72 (0.68-0.76)	0.02 (0.00-0.04)	0.94	0.065
Zytoplasmatisch/Adenokarzinom	PSMA	109	0.83 (0.82-0.85)	-0.02 (-0.03- -0.018)	0.99	0.076

Tabelle 4: a) Übersicht der Ergebnisse der Korrelationsanalyse des Vergleiches der CI zwischen mDBA und aDBA. b) Analog die Übersicht der Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse. 95%-KI angegeben in Klammern. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

3.1.3 Vergleich des Positivindex

Neben der CI wird häufig der PI in IHC-Studien erhoben, welcher den Anteil an Zellen innerhalb der ROI widerspiegelt, die eine bestimmte CI oberhalb eines festgelegten Schwellenwerts aufweisen. Ki-67 ist ein bekannter Biomarker für proliferative Zellpopulationen in Gewebeschnitten, der in der klinischen Routine entsprechend des PIs ausgewertet wird (Leung et al., 2019). Aus diesem Grund wurden die Expressionsmuster von Ki-67 in der Endometriumkarzinomen mit mDBA und aDBA untersucht.

Nachdem die Schwellenwerte, wie unter Material und Methoden beschrieben, zwischen den Programmen angepasst wurden, wurde der PI verglichen. Für die Kohorte von 106 Patient/-innen wurde mit mDBA ein durchschnittlicher PI von 23 % (SD 18 %) bestimmt respektive mit aDBA von 24 % (SD 18 %). Der PKK wurde berechnet und betrug 0.98 ($p < 0.001$). Es konnte ein starker linearer Zusammenhang der Messwerte gezeigt werden. Der LKK betrug 0.97 (95%-KI: 0.96-0.98) und deutet auf eine hohe Übereinstimmung hin. Analog zum Vergleich der Zelldetektion wurden Bland-Altman-Diagramme erstellt. Da die Differenzen der Messwerte jedoch keine Normalverteilung aufwiesen, wurde bei der Erstellung der Abbildung die durchschnittliche Abweichung der Messwerte durch deren Median ersetzt

und die 95%-LoA durch die 2.5 und 97.5 Perzentile, wie von J. M. Bland und D. G. Altman empfohlen (Bland und Altman, 1999). Der Median der Differenz in den Messungen betrug -1.2 % und war somit insgesamt niedriger in den Messungen mit mDBA. Die adaptierten 95%-LoA waren 15.7 % (95%-LoA: -7.7%-8%) breit (s. Abbildung 8).

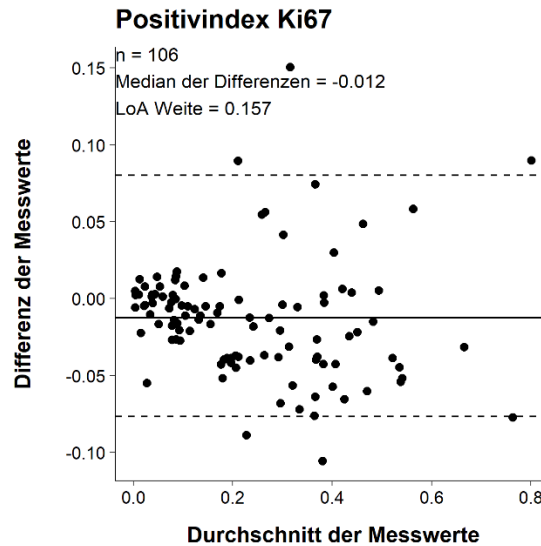


Abbildung 8: Bland-Altman-Diagramm mit Median der Differenzen der Messwerte von mDBA und aDBA, sowie LoA als 2.5 bzw. 97.5 Perzentile. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

3.1.4 Vergleich der Bearbeitungsdauer

Die klinische Arbeitsbelastung für Pathologen/-innen ist in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen, ebenso wachsen die Größen der Kohorten in der Forschung (Warth et al., 2016). Die aDBA sollte vor allem einen zeitlichen Vorteil der mDBA gegenüber leisten. Daher wurde die benötigte Zeit zur Analyse der Kohorten separat für mDBA sowie aDBA bestimmt.

Für die Datenerhebung mit mDBA wurden insgesamt 28.5 Stunden benötigt. Auf der anderen Seite benötigte die Analyse mit aDBA nur ca. ein Viertel der Zeit und betrug am Ende 7.25 Stunden. Es war ein signifikanter Unterschied in den Bearbeitungszeiten zu beobachten ($p < 0.001$) (s. Tabelle 5).

Zellkompartiment/Tumorarchitektur	Antikörper	n	Zeit in Stunden		p
			mDBA	aDBA	
Gesamt		515	28.5	7.25	< 0.001
Nukleär/Plattenepithel	CDK12	108	6	1.5	
Zytoplasmatisch/Plattenepithel	IL-6	86	5	1.25	
Nukleär/Adenokarzinom	EVII	106	5.5	1.5	
Zytoplasmatisch/Adenokarzinom	PSMA	109	5.5	1.5	
Nukleär/Adenokarzinom	Ki-67	106	6.5	1.5	

Tabelle 5: Auflistung der Arbeitsdauer getrennt nach den verschiedenen Kohorten. Generell wurde für alle Kohorte innerhalb eines Programms (mDBA oder aDBA) ungefähr die selbe Zeit benötigt. Bei mDBA lag diese Zeit bei ca. 5.7 Stunden bei aDBA pro Kohorte bei ungefähr 1.5 Stunden. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

3.2 Untersuchung der Expression der Zielproteine mittels digitaler Bildanalyse

3.2.1 CDK7 und pMED1

3.2.1.1 Färbemuster von CDK7 und pMED1

CDK7 und pMED1 sind nukleäre Proteine. So zeigte auch die IHC-Färbung ein nukleäres Muster. Die Färbung innerhalb einer Stanze zeigte sich homogen, das heißt die Unterschiede in der CI zwischen verschiedenen Zellen desselben Tumors waren gering (s. Abbildung 9). Zwischen den Patienten/-innen jedoch waren Unterschiede in der CI nachweisbar im Sinne einer Bandbreite an Messwerten (s. Abbildung 10). Einige Patienten/-innentriplets färbten sich nicht bzw. kaum an, wohingegen andere Triplets eine starke Färbung aufwiesen.

Um die Färbemuster in der Auswertung adäquat aufzugreifen, wurde für die weiteren Analysen entschieden die CI innerhalb der ROI als Maß für die Expression der Zielproteine zu verwenden. Aufgrund der Homogenität der Färbung wurde auf eine Verrechnung mit dem PI verzichtet, um keinen Bias aufgrund von subjektiv festgelegten Schwellenwerten in die Auswertung einzubringen (Paulsen et al., 2020). Im Folgenden wird nicht mehr von CI gesprochen, sondern von Expression. Um der geringen intratumoralen Heterogenität gerecht zu werden, wurde die durchschnittliche Expression pro Patienten/-innentriplett ermittelt.

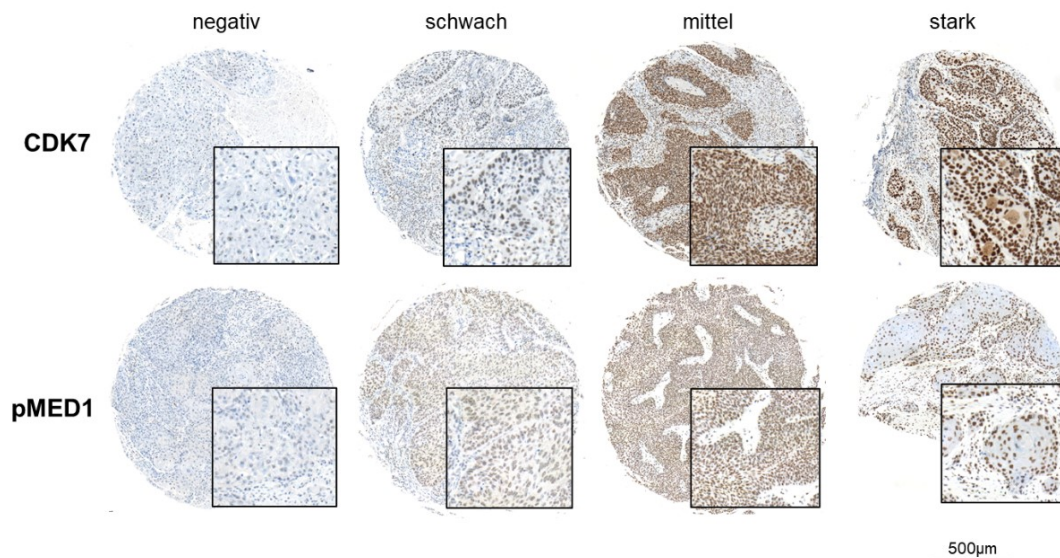
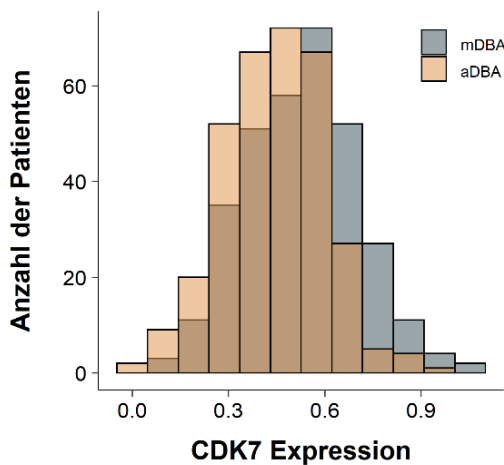


Abbildung 9: Expressionsmuster von CDK7 und pMED1 in der HNSCC-Kohorte. Die Tumorproben zeigten zwischen den Patienten/-innen eine Variationen in der Expression der Zielantigene. Innerhalb einer Tumorprobe war die Expression zwischen den angefärbten Zellen hingegen homogen. In einigen Stanzen zeigte sich keine Expression, entsprechend wurde die Expression hier als negativ angesehen. Über die Kohorte hinweg jedoch zeigten sich verschiedene Expressionsstärken. Die Abbildung zeigt Beispiele von Stanzen mit negativer, schwacher, mittlerer und starker Expression. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022a)

a)



b)

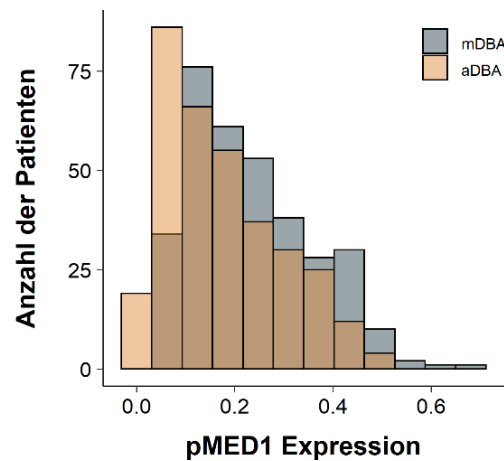


Abbildung 10: Histogramme zur Darstellung der Verteilung der Messwerte der **a)** CDK7-Expression und **b)** pMED1-Expression in den Primärtumoren. Für die pMED1-Expression zeigte sich eine linkssteile Verteilung, wohingegen die CDK7-Expression in der Kohorte normalverteilt war. Die Auswertungsmodalität ist farblich aufgeschlüsselt.

3.2.1.2 Korrelation von CDK7- und pMED1-Expression

Um den möglichen Zusammenhang einer CDK7-abhängigen Phosphorylierung von MED1 zu untersuchen, wurde eine Korrelationsanalyse der pMED1 und CDK7-Expression in verschiedenen Tumorgeweben (Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen und Rezidiven) durchgeführt und im Anschluss der PKK als Maß für den linearen Zusammenhang berechnet.

Unabhängig vom Tumorgewebe und Auswertungsart (mDBA oder aDBA) konnte eine signifikante Korrelation zwischen CDK7- und pMED1-Expression ($p < 0.05$) beobachtet werden. Die Stärke der Korrelation ist nach Chan in Abhängigkeit vom untersuchten Tumorgewebe mit mäßig bis stark anzugeben (Chan, 2003). Basierend auf der mDBA lagen die berechneten PKK zwischen 0.383 (95%-KI: 0.242-0.508, $p < 0.0001$) für Lymphknotenmetastasen und 0.712 (95%-KI: 0.335-0.893, $p = 0.002$) für Fernmetastasen. Zwischen den Auswertungsmodalitäten mDBA und aDBA zeigt sich in der Analyse kein relevanter Unterschied in Bezug auf die Stärke des linearen Zusammenhangs (s. Abbildung 11).

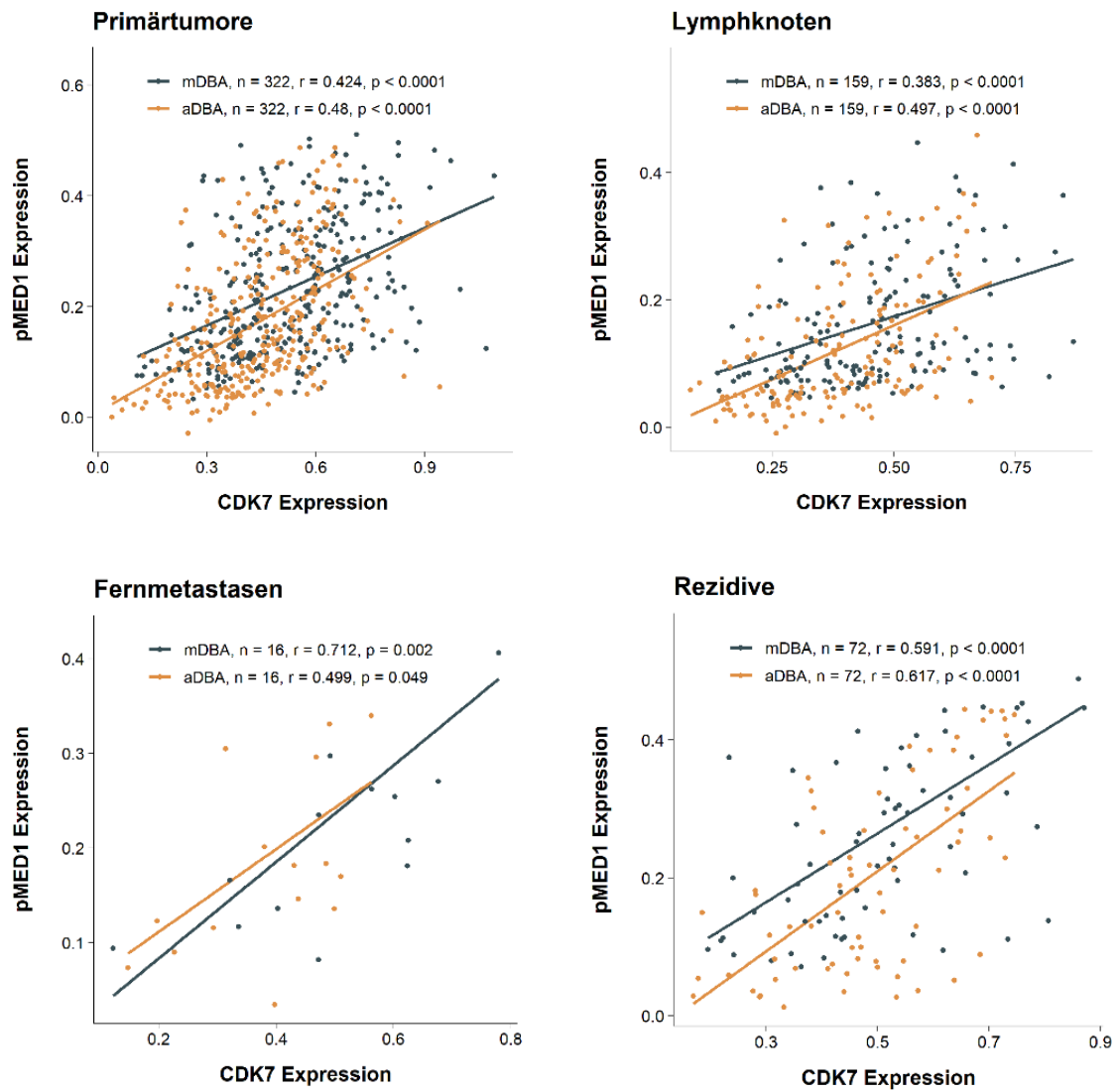


Abbildung 11: Streudiagramme mit Trendlinien für die verschiedenen Arten von Tumorgewebe. Es besteht ein mäßiger bis starker linearer Zusammenhang zwischen der CDK7- und pMED1-Expression über die Tumorgewebearten hinweg. Dies konnte für beide Modalitäten bestätigt werden. Die stärkste Korrelation der Expressionen fand sich in Fernmetastasen bestimmt mittels mDBA. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022a)

3.2.1.3 Prognostische Wertigkeit der CDK7- und pMED1-Expression

Unter der Arbeitshypothese einer CDK7 vermittelten Phosphorylierung von MED1, wurde im Folgenden die prognostische Relevanz einer kombinierten Expression dieser beiden Proteine bestimmt. Die Daten der obigen Korrelationsanalyse zeigten bereits einen linearen Zusammenhang der Expressionen dieser beiden Proteine. Wie in der Einleitung bereits geschildert könnte eine erhöhte CDK7-Expression zu vermehrter MED1-Phosphorylierung führen, was in der Konsequenz die Transkription stimuliert. Auch Onkogene könnten dadurch vermehrt transkribiert werden.

In die folgende Überlebensanalyse gingen die Daten von 314 Patienten/-innen ein. Entsprechend den Medianen der CDK7- bzw. pMED1-Expression in den Primärtumoren wurde unterschieden zwischen starker bzw. schwacher Proteinexpression. Daraus resultierten vier Gruppen: eine Gruppe mit einer starken Expression beider Proteine, eine Gruppe mit einer schwachen Expression beider Proteine und jeweils eine Gruppe, die eines der beiden Proteine stark exprimiert und das andere schwach.

Beim Vergleich in Bezug auf das 5-JÜ dieser Gruppen zeigte sich im Log-Rank-Test kein signifikanter Unterschied (mDBA $p = 0.1$; aDBA $p = 0.059$). Die niedrigste Überlebensrate wurde für die Gruppe bestimmt, welche eine starke CDK7- und eine schwache pMED1-Expression zeigte (mDBA 46%, 95%-KI: 33%-64%; aDBA 49%, 95%-KI: 37%-66%). Die Gruppe mit einer schwachen Expression beider Proteine zeigte die höchste Überlebensrate (mDBA 69%, 95%-KI: 60%-79%; aDBA 68%, 95%-KI: 60%-78%) (s. Abbildung 12 a), A. Abbildung 20 a)).

Interessanterweise bildeten sich Subgruppen in Bezug auf die CDK7-Expression. Gruppen mit starker CDK7-Expression hatten generell ein schlechteres 5-JÜ als Gruppen mit einer niedrigen CDK7-Expression unabhängig von der pMED1-Expression. Eine multivariable Cox-Regression, welche diese beiden Risikofaktoren mit einbezog, bestätigte dies für CDK7 (mDBA HR 1.58, 95%-KI: 1.07-2.34, $p = 0.022$; aDBA HR 1.71, 95%-KI: 1.15-2.55, $p = 0.009$) (s. Tabelle 6).

Im Folgenden wurde die Kohorte entsprechend der medianen CDK7-Expression aufgeteilt und auf das 5-JÜ und das 5-JKÜ hin untersucht. Hierzu wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und Log-Rank-Tests durchgeführt. Patienten/-innen mit einer starken CDK7-Expression hatten ein signifikant kürzeres 5-JÜ (mDBA $p = 0.029$; aDBA $p = 0.0068$) und 5-JKÜ (mDBA $p = 0.011$; aDBA $p = 0.00032$) (s. Abbildung 12 b) und c), A. Abbildung 20 b) und c)). In der mDBA lagen die 5-Jahresüberlebensraten in der stark CDK7 exprimierenden Gruppe bei 53 % (95%-KI: 45%-63%) gegenüber 66 % (95%-KI: 59%-75%) in der Gruppe mit schwacher Expression (s. Tabelle 7). Eine Aufschlüsselung über die klinischen Parameter der verglichenen Gruppen findet sich im Anhang in Tabelle 16 a).

Anschließend wurde eine multivariable Cox-Regression durchgeführt, um zu überprüfen, ob die CDK7-Proteinexpression als prognostischer Faktor für das 5-JÜ und das 5-JKÜ in der Kohorte unabhängig ist von anderen klinischen Eigenschaften und Risikofaktoren. Für diese Auswertung wurden die Risikofaktoren Alter, Nikotin- und Alkoholkonsum, p16-Status, UICC-Stadium und das Grading mit einbezogen. Den größten Effekt auf das 5-JÜ hatte in

der multivariablen Cox-Regression das UICC-Stadium (mDBA HR 2.16 95%-KI: 1.36-3.42, $p = 0.001$; aDBA HR 2.19, 95%-KI: 1.38-3.46, $p = 0.001$). Für das 5-JKÜ präsentierte sich ein ähnliches Bild, hier ging besonders ein positiver p16-Status mit einer verbesserten Prognose einher (mDBA HR 0.47, 95%-KI 0.28-0.78, $p = 0.004$; aDBA HR 0.45, 95%-KI 0.27-0.76, $p = 0.002$) und ein hohes UICC-Stadium mit einer verschlechterten Prognose (mDBA HR 1.81, 95%-KI 1.22-2.68, $p = 0.003$, aDBA HR 1.86, 95%-KI 1.26-2.77, $p = 0.002$) (s. Tabelle 8 a)).

Eine starke CDK7-Expression konnte als unabhängiger prognostischer Faktor für das 5-JÜ identifiziert werden. In der mDBA betrug der HR 1.56 (95%-KI 1.06-2.31, $p = 0.026$) in der aDBA 1.75 (95%-KI 1.18-2.61, $p = 0.006$). Das heißt, die Wahrscheinlichkeit unter diesen Patienten/-innen einen Endpunkt im Vergleich zur Referenzgruppe mit schwacher CDK7-Expression zu beobachten, war ca. eineinhalb Mal so groß. Auch für das 5-JKÜ zeigte sich eine starke CDK7-Expression in der multivariablen Cox-Regression als unabhängiger Risikofaktor. Basierend auf den mDBA Messwerten betrug der HR 1.62 (95%-KI: 1.14-2.30, $p = 0.007$). In der Untersuchung mittels aDBA betrug der HR 2.03 (95%-KI: 1.42-2.90, $p < 0.001$) (s. Tabelle 8 b)).

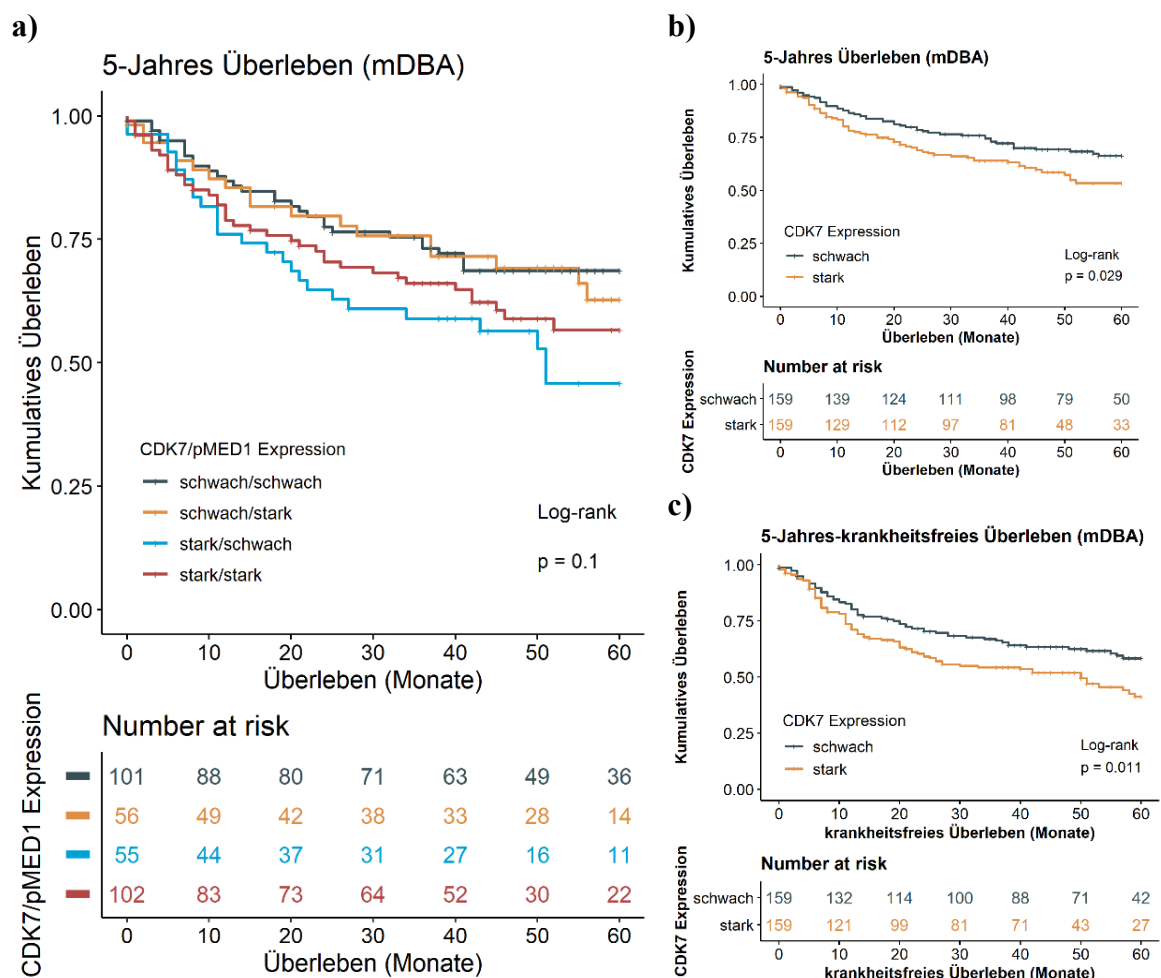


Abbildung 12: a) Entsprechend der medianen CDK7- und pMED1-Expression wurde die Kohorte in vier Gruppen aufgeteilt. Es wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und das Überleben verglichen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden hier lediglich die Daten der mDBA gezeigt. Die Daten zur aDBA finden sich im Anhang (s. A. Abbildung 20). Die niedrigste 5-Jahres Überlebensrate zeigte die Gruppe mit schwacher pMED1-Expression und starker CDK7-Expression. Jedoch waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant. Entsprechend der Überlebenskurven schien das 5-JÜ in erster Linie von der CDK7-Expression abhängig zu sein und unbeeinflusst von der pMED1-Expression. Daher wurde das b) 5-JÜ und das c) 5-JKÜ in Abhängigkeit von der CDK7-Expression untersucht. Es zeigte sich in beiden Fällen eine signifikant schlechtere Prognose bei starker CDK7-Expression. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022a)

5-JÜ	CDK7-Expression	mDBA		aDBA	
		HR (univariable)	HR (multivariable)	HR (univariable)	HR (multivariable)
CDK7-Expression	schwach	-	-	-	-
	stark	1.51 (1.04-2.19, p=0.030)	1.58 (1.07-2.34, p=0.022)	1.67 (1.15-2.42, p=0.007)	1.71 (1.15-2.55, p=0.009)
pMED1-Expression	schwach	-	-	-	-
	stark	1.12 (0.78-1.60, p=0.551)	0.91 (0.62-1.34, p=0.642)	1.16 (0.81-1.67, p=0.425)	0.94 (0.64-1.39, p=0.762)

Tabelle 6: In der multivariablen Cox-Regression konnte demonstriert werden, dass die starke Expression von CDK7 als Risikofaktor unabhängig von der pMED1-Expression ist und mit einem signifikant kürzeren Überleben der Patienten/-innen einhergeht. 95%-KI und p-Werte sind in Klammern vermerkt.

	<i>CDK7- Expression</i>	<i>mDBA</i>			<i>aDBA</i>		
		<i>Überlebensrate</i>	<i>95%-KI</i>	<i>p</i>	<i>Überlebensrate</i>	<i>95%-KI</i>	<i>p</i>
5-JÜ	schwach	66%	59%-75%	0.029	68%	60%-76%	0.0068
	stark	53%	45%-63%		52%	44%-62%	
5-JKÜ	schwach	58%	51%-67%	0.011	61%	53%-70%	0.00032
	stark	41%	33%-52%		39%	31%-49%	

Tabelle 7: Übersicht über die 5-JÜ- und 5-JKÜ-Raten bezogen auf die CDK7-Expression und geteilt nach Auswertungsmodalität mDBA oder aDBA. In beiden Modalitäten zeigten sich bei starker Expression niedrigere Überlebensraten der Patienten/-innen.

a)

5-JÜ CDK7		HR (univariable)	HR (multivariable)	
			mDBA	aDBA
CDK7-Expression (mDBA)	<i>schwach</i>	-	-	-
	<i>stark</i>	1.51 (1.04-2.19, p=0.030)	1.56 (1.06-2.31, p=0.026)	-
CDK7-Expression (aDBA)	<i>schwach</i>	-	-	-
	<i>stark</i>	1.67 (1.15-2.42, p=0.007)	-	1.75 (1.18-2.61, p=0.006)
Alter	<i>≤ 63 Jahre</i>	-	-	-
	<i>> 63 Jahre</i>	1.30 (0.93-1.82, p=0.130)	1.41 (0.95-2.08, p=0.089)	1.48 (0.99-2.20, p=0.054)
Alkoholkonsum	<i>No</i>	-	-	-
	<i>Yes</i>	1.75 (1.24-2.47, p=0.001)	1.30 (0.87-1.94, p=0.204)	1.30 (0.87-1.95, p=0.207)
Nikotinkonsum	<i>nein</i>	-	-	-
	<i>ja</i>	1.90 (1.00-3.62, p=0.052)	1.36 (0.65-2.85, p=0.410)	1.37 (0.65-2.86, p=0.404)
p16-Status	<i>negativ</i>	-	-	-
	<i>positiv</i>	0.46 (0.30-0.72, p=0.001)	0.58 (0.33-1.03, p=0.062)	0.57 (0.32-1.00, p=0.051)
UICC-Stadium	<i>UICC(I,II)</i>	-	-	-
	<i>UICC(III,IV)</i>	2.88 (1.93-4.28, p<0.001)	2.16 (1.36-3.42, p=0.001)	2.19 (1.38-3.46, p=0.001)
Grading	<i>G(1,2)</i>	-	-	-
	<i>G(3,4)</i>	1.34 (0.92-1.95, p=0.128)	1.65 (1.07-2.55, p=0.024)	1.64 (1.06-2.53, p=0.026)

b)

5-JKÜ CDK7		HR (univariable)	HR (multivariable)	
			mDBA	aDBA
CDK7-Expression (mDBA)	<i>schwach</i>	-	-	
	<i>stark</i>	1.54 (1.10-2.14, p=0.012)	1.62 (1.14-2.30, p=0.007)	
CDK7-Expression (aDBA)	<i>schwach</i>	-	-	-
	<i>stark</i>	1.84 (1.32-2.58, p<0.001)	-	2.03 (1.42-2.90, p<0.001)
Alter	<i>≤ 63 Jahre</i>	-	-	-
	<i>> 63 Jahre</i>	1.38 (1.03-1.86, p=0.033)	1.42 (1.00-2.02, p=0.047)	1.52 (1.07-2.16, p=0.021)
Alkoholkonsum	<i>No</i>	-	-	-
	<i>Yes</i>	1.50 (1.11-2.02, p=0.008)	1.19 (0.83-1.70, p=0.342)	1.19 (0.83-1.71, p=0.339)
Nikotinkonsum	<i>nein</i>	-	-	-
	<i>ja</i>	1.48 (0.89-2.44, p=0.128)	1.00 (0.55-1.79, p=0.988)	1.01 (0.56-1.82, p=0.970)
p16-Status	<i>negativ</i>	-	-	-
	<i>positiv</i>	0.44 (0.30-0.64, p<0.001)	0.47 (0.28-0.78, p=0.004)	0.45 (0.27-0.76, p=0.002)
UICC-Stadium	<i>UICC(I,II)</i>	-	-	-
	<i>UICC(III,IV)</i>	2.28 (1.65-3.16, p<0.001)	1.81 (1.22-2.68, p=0.003)	1.86 (1.26-2.77, p=0.002)
Grading	<i>G(1,2)</i>	-	-	-
	<i>G(3,4)</i>	1.08 (0.76-1.52, p=0.676)	1.30 (0.87-1.95, p=0.200)	1.29 (0.86-1.92, p=0.223)

Tabelle 8: Übersicht über die Ergebnisse der univariablen und multivariablen Cox-Regression zum **a)** 5-JÜ und **b)** 5-JKÜ. Die multivariablen Cox-Regressionen wurden jeweils für die Messwerte der mDBA und der aDBA berechnet. Es zeigt sich, dass eine starke CDK7-Expression ein unabhängiger prognostischer Faktor für das 5-JÜ und das 5-JKÜ ist. 95%-KI und p-Werte sind in Klammern vermerkt. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022a)

3.2.1.4 Korrelation der CDK7- und pMED1-Expressionen mit klinischen Daten

Des Weiteren wurden die Unterschiede der Expressionen der Zielproteine zwischen verschiedenen Untergruppen der Kohorte verglichen. Hierfür wurde die Expression in den Primärtumoren herangezogen. Die Untergruppen wurden entsprechend der Ausprägung verschiedener klinischer und pathologischer Merkmale gebildet. Für den Vergleich zwischen den Altersgruppen wurde die Kohorte entsprechend dem medianen Alter geteilt in Patienten/-innen älter bzw. jünger als 63 Jahre.

Jedoch blieben diese Analysen weitestgehend ohne signifikante Ergebnisse. Bei Patienten/-innen mit Fernmetastasen konnte eine höhere CDK7-Expression im Primärtumor detektiert werden. Dieser Unterschied war lediglich in der Auswertung mittels aDBA signifikant ($p = 0.03$) nicht aber in der mDBA ($p = 0.06$) (s. Tabelle 9). Für die analoge Auswertung zur pMED1-Expression ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die verglichenen klinisch-pathologischen Parameter der Kohorte (s. A. Tabelle 17).

CDK7								
<i>Klinisch-pathologische Parameter</i>			<i>mDBA</i>			<i>aDBA</i>		
		<i>n</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Median</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Median</i>	<i>p</i>
Geschlecht	<i>weiblich</i>	72	0.54	0.53	0.59	0.47	0.47	0.11
	<i>männlich</i>	253	0.52	0.54		0.44	0.44	
Alter	<i>≤ 63 Jahre</i>	164	0.52	0.51	0.32	0.43	0.44	0.36
	<i>> 63 Jahre</i>	160	0.54	0.55		0.45	0.45	
Alkoholkonsum	<i>nein</i>	176	0.51	0.52	0.14	0.43	0.43	0.32
	<i>ja</i>	139	0.54	0.55		0.45	0.45	
Nikotinkonsum	<i>nein</i>	34	0.51	0.54	0.40	0.43	0.44	0.47
	<i>ja</i>	275	0.53	0.54		0.45	0.45	
p16-Status	<i>negativ</i>	241	0.52	0.53	0.15	0.44	0.44	0.79
	<i>positiv</i>	85	0.55	0.56		0.45	0.45	
T-Stadium	<i>T(1,2)</i>	167	0.52	0.53	0.73	0.45	0.44	0.89
	<i>T(3,4)</i>	157	0.53	0.55		0.44	0.45	
N-Stadium	<i>N-</i>	145	0.51	0.51	0.06	0.44	0.43	0.70
	<i>N+</i>	179	0.54	0.55		0.45	0.46	
M-Stadium	<i>M-</i>	283	0.52	0.52	0.06	0.44	0.44	0.03
	<i>M+</i>	42	0.57	0.59		0.49	0.51	
UICC-Stadium	<i>UICC(I,II)</i>	127	0.53	0.54	0.89	0.45	0.46	0.39
	<i>UICC(III,IV)</i>	198	0.53	0.53		0.44	0.44	
Grading	<i>G(1,2)</i>	251	0.53	0.54	0.77	0.45	0.44	0.44
	<i>G(3,4)</i>	72	0.53	0.53		0.43	0.45	
Rezidiv im Verlauf	<i>nein</i>	255	0.53	0.54	0.75	0.44	0.44	0.13
	<i>ja</i>	71	0.52	0.51		0.47	0.49	

Tabelle 9: Übersicht des Vergleichs der CDK7-Expression in Primärtumoren, in Abhängigkeit von verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern der Kohorte. Der einzige signifikante Unterschied bestand in einer erhöhten Expression von CDK7 in Primärtumoren von Patienten/-innen mit positiven Fernmetastasenstatus im Vergleich zu Patienten/-innen mit negativen Status. Erstere zeigten eine stärkere Expression, wobei der Unterschied nur in der Auswertung mittels aDBA signifikant war. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022a)

3.2.1.5 CDK7-Expression nach Lokalisation

Da die Gruppe HNSCC verschiedene Lokalisationen von Karzinomen umfasst, darunter Oropharynx p16-positiv-, Oropharynx p16-negativ-, Hypopharynx-, Larynx- und Mundhöhlenkarzinome, wurde die CDK7-Expression in den Primärtumoren in Abhängigkeit von deren Entstehungsort untersucht, um zu evaluieren, inwieweit eine bestimmte Subgruppe eine abweichende CDK7-Expression aufweist und dementsprechend in einer folgenden Subgruppenanalyse separater Betrachtung bedarf. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ursprungsorten der Primärtumore in Bezug auf die CDK7-Expression gezeigt werden. Dies galt sowohl in der Analyse mit mDBA ($p = 0.7$) als auch in der Auswertung mittels aDBA ($p = 0.95$) (s. Abbildung 13). Für die weiteren Untersuchungen wurde daher auf Subgruppenanalysen bestimmter Lokalisationen verzichtet.

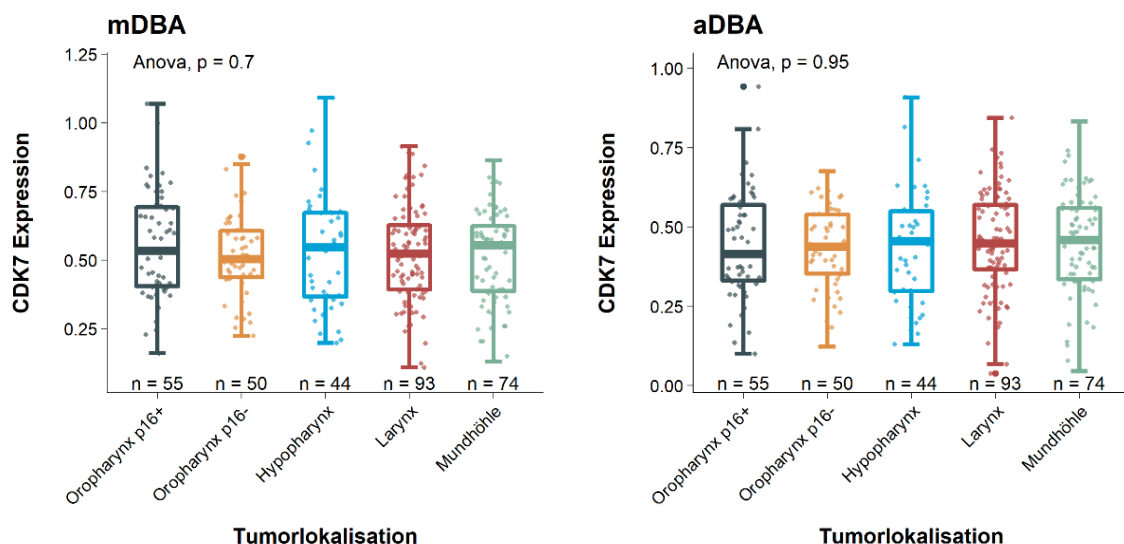


Abbildung 13: Vergleich der CDK7-Expressionen in Primärtumoren in Abhängigkeit von deren Lokalisation. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. In allen Lokalisationen war die Expression von CDK7 auf einem ähnlichen Niveau. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022a)

3.2.1.6 CDK7-Expression in verschiedenen Tumorgewebearten

Im Anschluss wurde die CDK7-Expression in Tumorgeweben von Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen und Rezidiven betrachtet, um mögliche Expressionsunterschiede zu ermitteln. Eine ANOVA zeigte signifikante Unterschiede zwischen den oben aufgeführten Gruppen, sowohl in der Auswertung mit mDBA ($p = 0.00032$) als auch mit aDBA ($p < 0.0001$). Eine post-hoc-Analyse mittels multiplen t-Tests gegen die Referenzgruppe der Primärtumore zeigte eine signifikant niedrigere CDK7-Expression in den Lymphknotenmetastasen (mDBA adjustiert $p < 0.0001$; aDBA adjustiert $p = 0.00038$) (s. Abbildung 14).

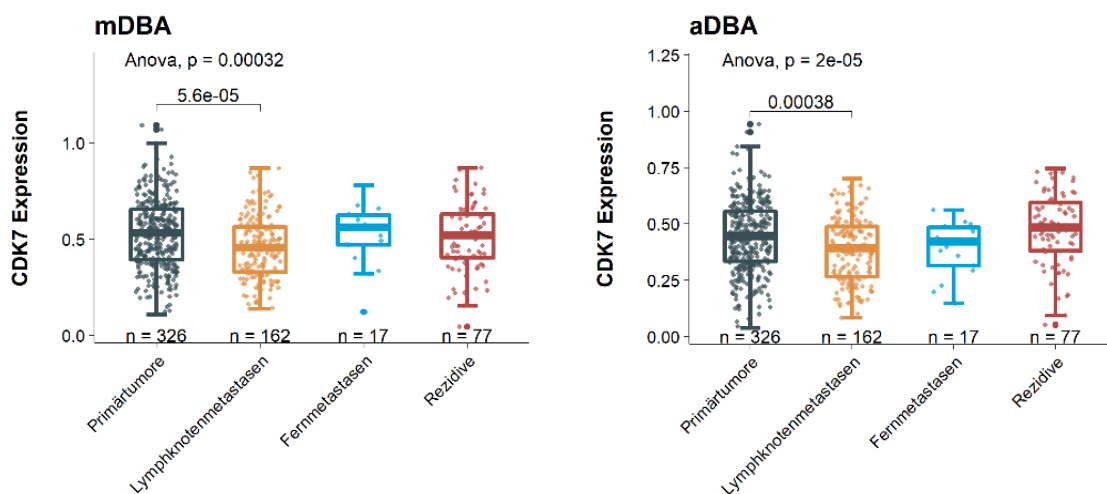


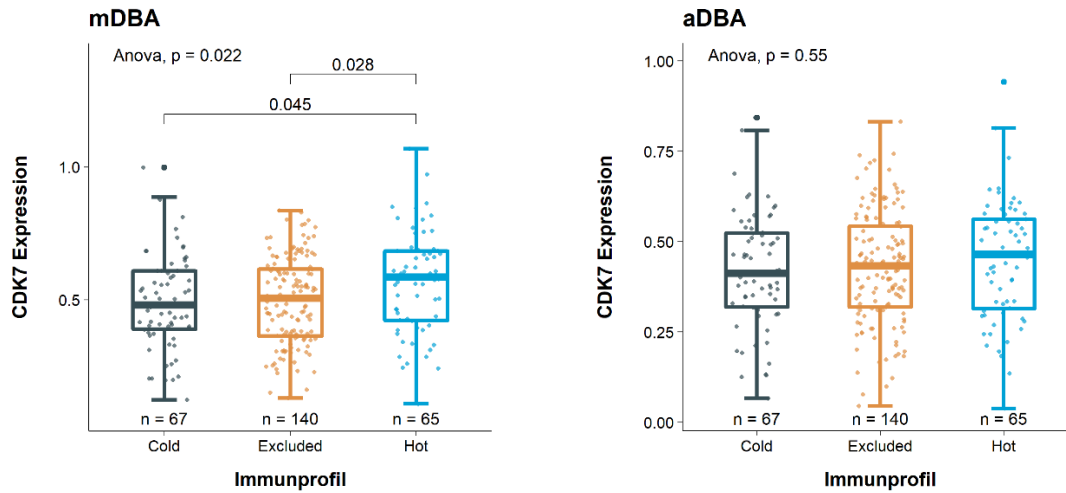
Abbildung 14: Vergleich der CDK7-Expression zwischen Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen und Rezidiven. Die CDK7-Expression in den Lymphknotenmetastasen war signifikant niedriger als in den Primärtumoren. Alle anderen Vergleiche wiesen keine Signifikanz auf. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022a)

3.2.1.7 CDK7-Expression nach Immunprofil

Eine ANOVA zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Immunprofilen in der mDBA ($p = 0.022$). Hot Tumore zeigten eine höhere Expression von CDK7 als Excluded und Cold Tumore. Ein folgender post-hoc t-Test bestätigte signifikante Differenzen zwischen diesen Gruppen (Hot vs. Cold adjustiert $p = 0.045$; Hot vs. Excluded adjustiert $p = 0.028$). In der Auswertung durch aDBA zeigten zwar auch die Hot Tumore die höchste Expression, jedoch waren die Unterschiede zu den anderen beiden Immunprofilen nicht signifikant (s. Abbildung 15 a)).

Nachfolgend wurde die CDK7-Expression zwischen Tumoren mit einem PD-L1 TPS ≥ 20 % und < 20 % untersucht. Die Einteilung orientiert sich an dem Median der Kohorte. Es konnte in der Auswertung mittels mDBA eine signifikant höhere CDK7-Expression in Tumoren mit einem PD-L1 TPS ≥ 20 % beobachtet werden ($p = 0.013$). Auch in der aDBA zeigten Tumore mit einem PD-L1 TPS ≥ 20 % eine höhere CDK7-Expression, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p = 0.068$) (s. Abbildung 15 b)).

a)



b)

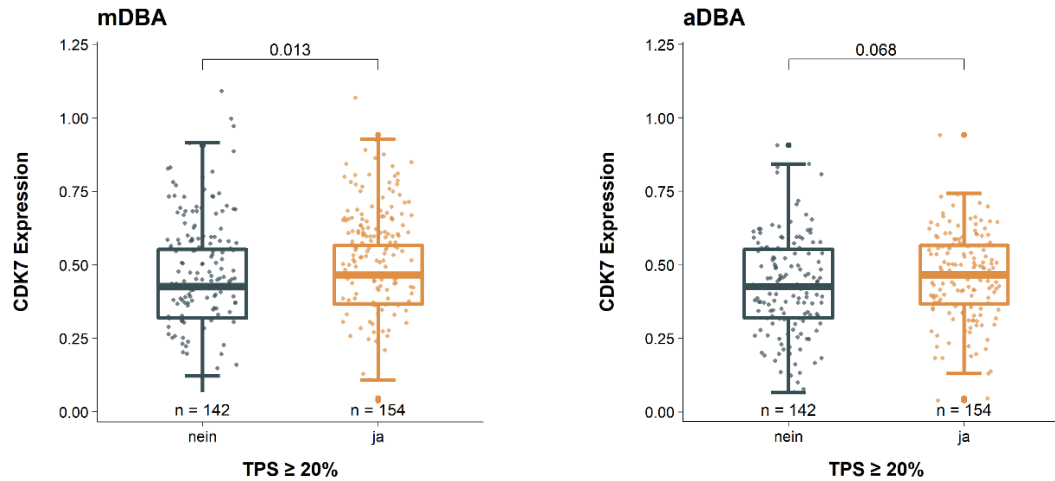


Abbildung 15: a) Darstellung der CDK7-Expression in Abhängigkeit vom Immunprofil der Primärtumore. Gemessen an Cold und Excluded Tumoren zeigten die Hot Tumore in beiden Auswertungen die höchste Expression, dieser Unterschied war allerdings nur in der Auswertung mit mDBA signifikant. **b)** Gegenüberstellung der CDK7-Expression von Primärtumoren mit einem TPS von $\geq 20\%$ und $< 20\%$. Es zeigte sich eine signifikant höhere Expression in den Tumoren mit einem höheren TPS in der Auswertung mittels mDBA. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022a)

3.2.2 CDK12

3.2.2.1 Färbemuster von CDK12

Die IHC-Färbung von CDK12 wurde bereits im Abschnitt Ergebnisse unter dem Punkt 3.1.2 Färbeintensitätsbestimmung beschrieben. Eine Abbildung zur Verteilung der Messwerte findet sich im Anhang (s. A. Abbildung 21).

3.2.2.2 Korrelation der CDK12-Expression mit klinischen Daten

Analog zum Vorgehen bei der Auswertung der CDK7- und pMED1-Expression, wurden auch die gewonnenen Expressionsdaten von CDK12 zwischen verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern der Kohorte verglichen. Als signifikante Ergebnisse in der Auswertung mittels mDBA konnte eine erhöhte CDK12-Expression bei Patienten/-innen, mit regelmäßigen Alkoholkonsum ($p = 0.02$) gezeigt werden. Dieses Ergebnis ließ sich in der aDBA nicht reproduzieren ($p = 0.11$). Übereinstimmend hingegen war in beiden Auswertungen ein signifikanter Unterschied zwischen der CDK12-Expression in den Primärtumoren von Patienten/-innen, welche ein Rezidiv entwickelten, und Patienten/-innen, die kein Rezidiv aufwiesen, zu erkennen. Patienten/-innen mit Rezidiv in der Nachsorge hatten eine gegenüber der Vergleichsgruppe signifikant erhöhte CDK12-Expression im Primärtumor ($p < 0.0001$) (s. Tabelle 10).

CDK12								
Klinische Parameter		mDBA				aDBA		
		n	Mittelwert	Median	p	Mittelwert	Median	p
Geschlecht	<i>weiblich</i>	71	0.17	0.17	0.88	0.17	0.19	0.48
	<i>männlich</i>	253	0.17	0.17		0.16	0.15	
Alter	<i>≤ 63 Jahre</i>	162	0.18	0.18	0.23	0.17	0.16	0.22
	<i>> 63 Jahre</i>	161	0.16	0.15		0.15	0.14	
Alkoholkonsum	<i>nein</i>	176	0.16	0.15	0.02	0.15	0.14	0.11
	<i>ja</i>	138	0.18	0.19		0.17	0.17	
Nikotinkonsum	<i>nein</i>	34	0.16	0.14	0.32	0.15	0.13	0.58
	<i>ja</i>	274	0.17	0.17		0.16	0.15	
p16-Status	<i>negativ</i>	242	0.17	0.17	0.29	0.16	0.15	0.31
	<i>positiv</i>	83	0.16	0.15		0.15	0.15	
T-Stadium	<i>T(1,2)</i>	162	0.17	0.16	0.68	0.16	0.15	0.99
	<i>T(3,4)</i>	161	0.17	0.18		0.16	0.15	
N-Stadium	<i>N-</i>	142	0.17	0.17	0.53	0.16	0.16	0.23
	<i>N+</i>	181	0.17	0.16		0.15	0.14	
M-Stadium	<i>M-</i>	281	0.17	0.16	0.25	0.16	0.15	0.61
	<i>M+</i>	43	0.18	0.19		0.16	0.17	
UICC-Stadium	<i>UICC(I,II)</i>	123	0.17	0.16	0.99	0.16	0.16	0.66
	<i>UICC(III,IV)</i>	201	0.17	0.17		0.16	0.14	
Grading	<i>G(1,2)</i>	255	0.17	0.17	0.22	0.16	0.16	0.05
	<i>G(3,4)</i>	67	0.16	0.14		0.14	0.12	
Rezidiv im Verlauf	<i>nein</i>	253	0.16	0.14	<0.0001	0.15	0.13	<0.0001
	<i>ja</i>	72	0.22	0.21		0.20	0.21	

Tabelle 10: Übersicht des Vergleichs der CDK12-Expression in Primärtumoren, in Abhängigkeit von verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern der HNSCC-Kohorte. Auffällig in beiden Auswertungen ist ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten/-innen mit und ohne Rezidiv in der Nachsorge. Patienten/-innen mit Rezidiv in der Nachsorge hatten eine erhöhte CDK12-Expression.

3.2.2.3 CDK12-Expression in verschiedenen Tumorgewebearten

Um den Zusammenhang von CDK12-Expression und Rezidiven weiter zu untersuchen, wurde die CDK12-Expression in den Primärtumoren der Expression in den anderen drei Tumorgewebearten gegenübergestellt. Sowohl in der mDBA als auch in der aDBA wiesen Fernmetastasen (mDBA adjustiert $p = 0.0035$; aDBA adjustiert $p = 0.0038$) und Rezidive (mDBA adjustiert $p < 0.0001$; aDBA adjustiert $p = 0.041$) eine gegenüber den Primärtumoren signifikant erhöhte Expression auf. In der aDBA wiesen zusätzlich Lymphknotenmetastasen eine signifikant erniedrigte Expression im Vergleich zum Primarius auf (adjustiert $p < 0.0001$). Eine gepaarte Analyse von Primärtumoren und Rezidiven zeigte keinen signifikanten Unterschied in der CDK12-Expression (mDBA $p = 0.29$, aDBA $p = 0.099$) (s. Abbildung 16, A. Abbildung 22). Um eine Änderung der CDK12-Expression in Abhängigkeit von der Behandlung auszuschließen, wurden Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für die Therapiegruppen Radiotherapie, Chemotherapie und OP durchgeführt. Für keine dieser Subgruppen konnten in der mDBA oder der aDBA signifikante Unterschiede in der Expression zwischen Primärtumor und Rezidiv gefunden werden (mDBA Radiotherapie: $p = 0.58$, Chemotherapie: $p = 0.72$, OP: $p = 0.6$; aDBA Radiotherapie: $p = 0.47$, Chemotherapie: $p = 0.59$, OP: $p = 0.23$).

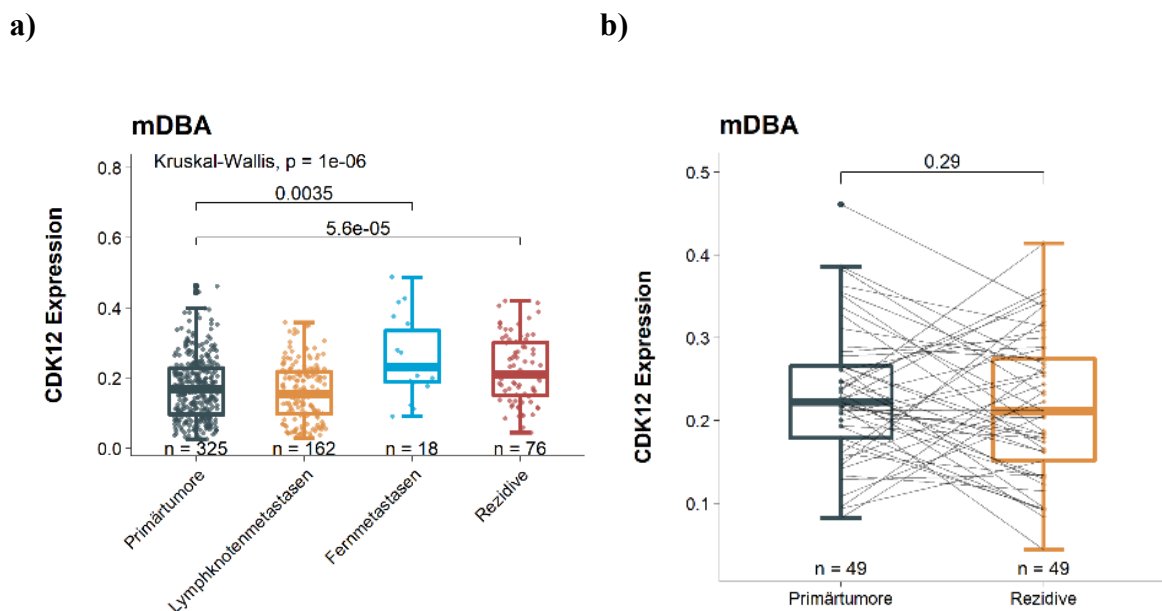


Abbildung 16: a) Gegenüberstellung der CDK12-Expression zwischen verschiedenen Tumorgeweben und der Referenzgruppe der Primärtumore. Signifikant waren die Unterschiede zwischen Primärtumoren und Fernmetastasen sowie zwischen Primärtumoren und Rezidiven. Rezidive und Fernmetastasen zeigten jeweils eine höhere Expression als die Primärtumore. b) In der gepaarten Analyse von Primärtumoren und Rezidiven konnte kein Unterschied in der Expression festgestellt werden. In der Abbildung sind lediglich die Daten der mDBA, aus Gründen der Übersichtlichkeit gezeigt. Für die Daten zur aDBA s. A. Abbildung 22. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

3.2.2.4 Prognostische Wertigkeit der CDK12-Expression

Aufgrund der erhöhten CDK12-Expression in Primärtumoren der Patientengruppe mit Rezidiv in der Nachsorge wurde die prognostische Wertigkeit der CDK12-Expression in Bezug auf das 5-JKÜ betrachtet.

Zuerst wurde die AUROC berechnet. Endpunkt war das Auftreten eines Rezidivs in der Nachsorge. In der Auswertung mittels mDBA hatte die AUROC eine Fläche von 0.698. Für die Messwerte mittels aDBA war die AUROC vergleichbar jedoch etwas kleiner mit 0.683. Ausgedrückt in Anlehnung an Safari et al. betrug damit die Wahrscheinlichkeit ca. 70 %, dass ein/e zufällig ausgewählter/e Patient/-in aus der Gruppe mit Rezidiv eine höhere CDK12-Expression im Primärtumor aufwies als ein/e zufällig ausgewählter/e Patient/-in aus der Vergleichsgruppe ohne Rezidiv (Safari et al., 2016). Die ROC-Kurve diente im Anschluss dazu den optimalen Schwellenwert für die CDK12-Expression im Primärtumor zu bestimmen, um die Patienten/-innen für die folgende Überlebensanalyse zu stratifizieren. Der ermittelte Wert lag bei 0.163 für mDBA und respektive bei 0.151 für aDBA (s. Abbildung 17 a)).

Beruhend auf der Einteilung nach diesen Werten zeigte sich ein signifikant kürzeres 5-JKÜ von Patienten/-innen mit starker CDK12-Expression verglichen mit den Patienten/-innen mit schwacher CDK12-Expression (mDBA $p < 0.0001$; aDBA $p = 0.0016$). Bei starker CDK12-Expression ergab sich in der mDBA eine 5-Jahres Überlebensrate von 36 % (95%-KI: 27%-46%) und von 62 % (95%-KI: 54%-71%) bei schwacher Expression sowie entsprechend in der aDBA 58 % (95%-KI: 50%-67%) bei schwacher Expression und 38 % (95%-KI: 29%-49%) bei starker Expression (s. Abbildung 17 b)). Die klinischen Daten der verglichenen Gruppen finden sich im Anhang in Tabelle 16 b).

Eine multivariable Cox-Regression wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob der Effekt einer starken CDK12-Expression unabhängig war von anderen Risikofaktoren. Die Risikofaktoren wurden bereits in der Analyse zu CDK7 definiert. Sowohl in der mDBA (HR 2.20, 95%-KI: 1.54-3.15, $p < 0.001$) als auch in der aDBA (HR 2.07, 95%-KI: 1.45-2.96, $p < 0.001$) zeigte sich die CDK12-Expression als unabhängiger Risikofaktor für das 5-JKÜ in der Kohorte (s. Tabelle 11).

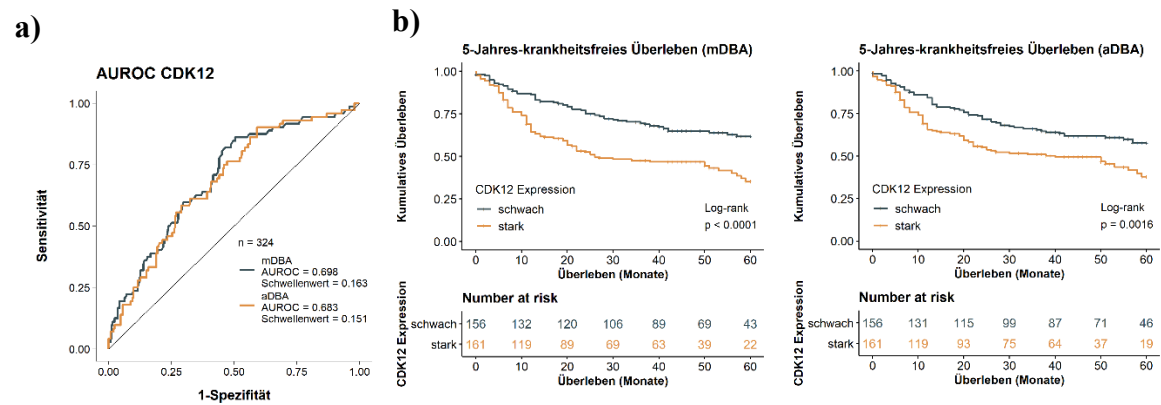


Abbildung 17: a) ROC-Kurve basierend auf den Daten der DBA bezüglich des Endpunkts Rezidiv. Beide Verfahren generierten eine ungefähr gleichgroße AUROC. Es wurde der optimale Schwellenwert für beide Verfahren bestimmt, um die Kohorte entsprechend für eine Überlebensanalyse im Bezug auf das 5-JKÜ zu stratifizieren. b) Hier zeigte sich im Log-Rank-Test ein signifikanter Unterschied in der Prognose zwischen den beiden Gruppen. Die Gruppe mit schwacher CDK12-Expression zeigten ein längeres Überleben. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

5-JKÜ CDK12		HR (univariable)	HR (multivariable)	
			mDBA	aDBA
CDK12-Expression (mDBA)	schwach	-	-	-
	stark	2.06 (1.47-2.88, p<0.001)	2.20 (1.54-3.15, p<0.001)	-
CDK12-Expression (aDBA)	schwach	-	-	-
	stark	1.69 (1.22-2.36, p=0.002)	-	2.07 (1.45-2.96, p<0.001)
Alter	≤ 63 Jahre	-	-	-
	> 63 Jahre	1.38 (1.03-1.86, p=0.033)	1.40 (0.99-1.98, p=0.056)	1.35 (0.96-1.90, p=0.089)
Alkoholkonsum	No	-	-	-
	Yes	1.50 (1.11-2.02, p=0.008)	1.10 (0.77-1.57, p=0.589)	1.08 (0.76-1.54, p=0.665)
Nikotinkonsum	nein	-	-	-
	ja	1.48 (0.89-2.44, p=0.128)	0.98 (0.54-1.76, p=0.938)	1.02 (0.57-1.83, p=0.954)
p16-Status	negativ	-	-	-
	positiv	0.44 (0.30-0.64, p<0.001)	0.49 (0.30-0.81, p=0.005)	0.44 (0.27-0.73, p=0.002)
UICC-Stadium	UICC(I,II)	-	-	-
	UICC(III,IV)	2.28 (1.65-3.16, p<0.001)	2.02 (1.35-3.00, p=0.001)	2.12 (1.42-3.16, p<0.001)
Grading	G(1,2)	-	-	-
	G(3,4)	1.08 (0.76-1.52, p=0.676)	1.46 (0.97-2.18, p=0.069)	1.48 (0.98-2.22, p=0.059)

Tabelle 11: In der multivariable Cox-Regression konnte eine starke CDK12-Expression als unabhängiger Risikofaktor für das 5-JKÜ bestätigt werden und ging mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben einher. 95%-KI und p-Werte sind in Klammern vermerkt.

3.2.2.5 CDK12-Expression nach Immunprofil

Beim Vergleich der CDK12-Expression in den Primärtumoren zwischen den verschiedenen Immunprofilen der Tumore wurde die höchste Expression in den Hot Tumoren gefunden. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant (mDBA $p = 0.051$, aDBA $p = 0.15$) (s. Abbildung 18).

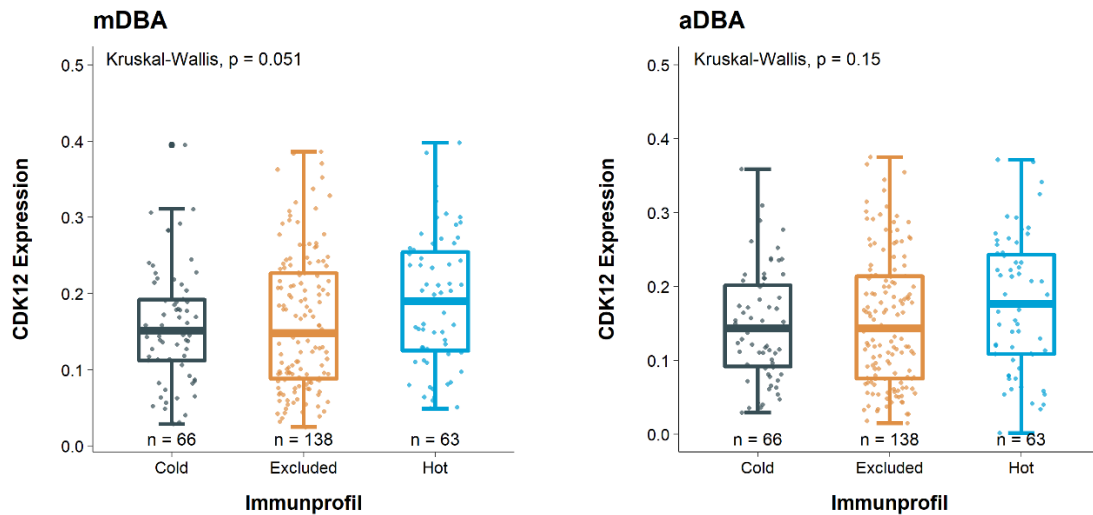


Abbildung 18: Darstellung der CDK12-Expression in Abhängigkeit vom Immunprofil der Primärtumore. Die höchste Expression wurde in den immuninfiltrierten Hot Tumoren gefunden. Die Unterschiede zu den Cold und Excluded Tumoren waren nicht signifikant.

4 Diskussion

4.1 Übersicht

Analog zur Gliederung der Einleitung sollen im Folgenden zunächst die Resultate aus der Etablierung der aDBA diskutiert werden und anschließend die Ergebnisse aus den Proteinexpressionsstudien zu CDK7, pMED1 und CDK12.

4.2 Diskussion der Ergebnisse zum Vergleich der digitalen Bildanalyse

Die digitale Pathologie gehört schon seit längerem zum Repertoire der onkologischen Forschung. Dennoch nutzen viele publizierte Proteinexpressionsstudien rein visuelle Scoring-Methoden, um die Art und Intensität der Färbung quantitativ zu beurteilen. Dadurch können wertvolle Informationen verloren gehen. Gerade feine Nuancen mittlerer Färbeintensität können nur unzureichend mit dem bloßen Auge unterschieden werden (Aeffner et al., 2017). Die rein visuelle Beurteilung von IHC-Präparaten resultiert daher häufig in einer bimodalen Verteilung der Expression (Collins et al., 2005). Wobei derartige Verteilungen in anderen quantitativen Referenzverfahren nicht beobachtet werden können (Rimm, 2006).

Digitale Pathologie wurde unter anderem eingeführt, um diese Limitationen zu überwinden. Im Gegensatz zu der visuellen Bildauswertung, die lediglich diskrete Werte zur Beurteilung der CI liefern kann, erlaubt es die DBA stetige Maße zu erheben. Diese sind objektiver und bieten mehr Möglichkeiten in der Auswertung (Rizzardi et al., 2012; Braun et al., 2013; Feuchtinger et al., 2015; Aeffner et al., 2017).

Vorausgegangene Studien haben bereits verschiedene Auswertungsmodalitäten miteinander verglichen. Die Arbeitsgruppe von Braun et. al hat auf diesem Gebiet bereits eine hohe Korrelation zwischen visuellen Scoring und mDBA zeigen können (Ergebnisse der Arbeitsgruppe (Braun et al., 2013)). Feuchtinger et. al konnten darlegen, dass Biomarker ohne prognostische Wertigkeit im visuellen Scoring, nach der mDBA dennoch genutzt werden konnten, um Patienten/-innen signifikant nach dem Überleben zu stratifizieren (Feuchtinger et al., 2015). Diese Studien beschränkten sich jedoch auf mDBA.

4.2.1 Ergebnisse

Die hier vorliegende Arbeit bestätigt, dass aDBA unter der Verwendung eines RF-Algorithmus als Alternative zu mDBA genutzt werden kann. Durch den Vergleich der Zelldetektion in definierten Gewebebereichen konnte eine mögliche Verzerrung späterer

Ergebnisse durch diese ausgeschlossen werden. Bei dieser Messung zeigten aDBA und mDBA eine sehr hohe Korrelation.

In der Analyse der CI einzelner Zellen offenbarte sich ein sehr starker linearer Zusammenhang zwischen den Verfahren. Jedoch erhob die aDBA systematisch höhere Messwerte. Auf eine Umrechnung der einen in die andere Einheit wurde aus folgendem Grund verzichtet. Für die aDBA müssen die Farbvektoren bestimmt werden und dementsprechend könnte sich der Umrechnungsfaktor zwischen den Analysen ändern. Die Einführung eines Umrechnungsfaktors würde damit eine nicht vorhandene Beständigkeit suggerieren.

Die auf den Messwerten von den Patiententriplets der vier Kohorten basierende CI diene als Surrogatparameter für die Erkennung der ROI. Bei Vergleichbarkeit der Messwerte wäre auf eine äquivalente ROI-Detektion zu schließen. Unabhängig von der untersuchten Kohorte zeigte sich eine starke Korrelation. Überraschender Weise waren die aDBA Messwerte pro Triplet niedriger als die der mDBA. Entsprechend der vorausgegangenen Analyse einzelner Zellen wurde ein umgekehrtes Bild erwartet. Eine Betrachtung einzelner Stenzen zeigte, dass die aDBA häufig negative Tumorzellen erkannte, welche im Tumorstroma verteilt lagen.

Systematischer Bias ist eine bekannte Eigenschaft von RF-Modellen, was die divergierenden Messwerte zum Teil erklärt (Sarica et al., 2017; Viratham Pulsawatdi et al., 2020). Es kann zusätzlich vermutet werden, dass in der Auswertung mittels mDBA oft stark positive Areale des Tumors annotiert wurden. Diese überschatteten optisch Bereiche schwächerer Färbung, was die Abweichung verstärkt haben könnte (Aeffner et al., 2017). Dennoch sollten derartige Messwerte nicht in absoluten Zahlen betrachtet werden, da sie zwischen verschiedenen Programmen der digitalen Pathologie nicht übertragbar sind. Stattdessen sollte sich die Auswertung an Lagemaßen der vorliegenden Verteilung orientieren, wie z.B. dem Median, dem Mittelwert oder den Quantilen. Diese sind weniger anfällig für Interobserver-Variabilität (Idel et al., 2020; Klapper et al., 2020; Paulsen et al., 2020) und bringen, wenn a priori definiert, keinen Bias in die Auswertung (Altman et al., 2012). In einer digital ausgewerteten IHC-Studie von Loughrey et al. wichen die Rohdaten der Messwerte von Untersucher/-in zu Untersucher/-in signifikant voneinander ab. Wurde die Kohorte für die Überlebensanalyse aber den Medianen gemäß eingeteilt, erhoben alle Untersucher/-innen übereinstimmende Ergebnisse (Loughrey et al., 2018). Als generelle Lösung für dieses Problem könnte eine Standardisierung der Messwerte mittels z-Transformation dienen. Die Messwerte werden durch Subtraktion des Mittelwerts zentriert und im Anschluss im Verhältnis zur Standardabweichung angegeben (Cheadle et al., 2003).

In Bezug auf den PI, konnte in dieser Arbeit eine hohe Übereinstimmung von mDBA und aDBA nachgewiesen werden. Damit wurden die Resultate vorausgegangener Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Die Studie von Rizzardi et al. kommt zu ähnlichen Ergebnissen in Bezug auf die Übereinstimmung von aDBA und mDBA bei der Erhebung des PI (Rizzardi et al., 2012). Die verbleibenden Differenzen zwischen den Methoden der DBA könnten unter anderem auf den visuell kalibrierten Schwellenwerten für die Positiv-/Negativklassifikation der Zellen zurück zu führen sein, wie im Teil Material und Methoden beschrieben.

Abschließend wurde die Anwendbarkeit von aDBA als Alternative zur mDBA im Kontext zweier klinischer Biomarkerstudie betrachtet. Die gewonnenen Daten belegen, dass nahezu alle klinisch relevanten Ergebnisse der Auswertung mit beiden Ansätzen reproduziert werden konnten.

Bei der Betrachtung des klinischen Outcomes von Brustkrebspatientinnen in Abhängigkeit von der Ki-67 und p53 Expression in vorherigen Studien, konnte gezeigt werden, dass aDBA vergleichbare Ergebnisse zur konventionellen visuellen Auswertung liefert (Bankhead et al., 2018). Gleiches bestätigte sich für diverse Markerproteine in Kolonkarzinomen. In diesen IHC-Studien konnte eine hohe Korrelation von visuellem Scoring und aDBA festgestellt werden (Ong et al., 2010; Loughrey et al., 2018).

Neben der klinischen Tätigkeit sind Pathologen/-innen oft in die Forschung mit eingebunden. Es ist aufgrund der begrenzten zur Verfügung stehenden Zeit erstrebenswert repetitive Aufgaben, sowohl im Labor als auch vor dem Rechner zu reduzieren. Dazu gehört zum Beispiel auch das Markieren von Tumorarealen in IHC-Schnitten zu Forschungszwecken. Um die Arbeitsbelastung gering zu halten, könnte aDBA ein nützliches Werkzeug sein. Für die Auswertung mittels aDBA wurde lediglich ca. ein Viertel des Zeitbedarfs beobachtet, der für die entsprechende mDBA notwendig war. Ähnliches konnte bereits durch weitere Studien bestätigt werden (Ong et al., 2010; Rizzardi et al., 2012). Interessant war in diesen Studien, dass die benötigte Zeit für die visuelle Auswertung von Tumorproben, exponentiell mit der Anzahl der Proben stieg, während der Anstieg für die aDBA linear war, was vermutlich auf die Ermüdung des/der Untersuchenden zurückzuführen ist (Ong et al., 2010). Da künftige Analysen an Komplexität und Umfang zunehmen werden, wird diesem Faktor mehr und mehr Gewicht zukommen.

4.2.2 Schwächen

Es wird darauf hingewiesen, dass wie bei allen IHC-Studien die Ergebnisse von der präanalytischen Qualität der Objektträger und des Gewebes abhängen (Taylor und Levenson, 2006). Bei Anwendung von aDBA ist der/die Nutzer/-in nicht gezwungen, jeden einzelnen Objektträger auf Artefakte hin zu beurteilen. Bis zu einem gewissen Grad können bestimmte Artefakte (z.B. Gewebefalten) von aDBA erkannt und von der Analyse exkludiert werden, gegenüber anderen Artefakten bleibt der Algorithmus jedoch blind. Daher sind visuelle Kontrollen zur Qualitätswahrung trotzdem notwendig, um Beeinflussungen der Daten zu vermeiden. Diese Kontrollen wurden in der vorliegenden Studie durchgeführt. Alle Stenzen, die in der mDBA aufgrund von Artefakten oder mangelnder Gewebequalität nicht beachtet wurden, wurden auch von der aDBA ausgeschlossen.

Für den RF-Algorithmus wurden bewusst die Standardeinstellungen beibehalten (Martino et al., 2020). Das Ziel war es die Einfachheit der Anwendung zu unterstreichen und die Robustheit dieses Algorithmus. In Proteinexpressionsstudien werden häufig verschiedene Markerproteine immunhistochemisch gefärbt und nicht selten umfassen derartige Studien verschiedene Arten von Karzinomen. Für jede Kombination von Antikörper und Karzinom könnten die Hyperparameter des RF optimiert werden, um exaktere Ergebnisse zu generieren. Die visuelle Kontrolle zeigte, dass auch mit den Standardeinstellungen eine adäquate Detektion der Tumorzellen erreicht werden konnte.

Die Quantifizierung der DAB-Färbung in IHC-Präparaten ist problematisch. DAB-Färbungen folgen nicht dem Lambert-Beerschen Gesetz, da das Licht eher gestreut und nicht absorbiert wird (s. Color Deconvolution) (Helps et al., 2012). Auch sind Antikörper-Antigen-Reaktion nicht stochiometrisch (Helps et al., 2012; Guirado et al., 2018). Dennoch demonstrierten Studien, dass eine starke lineare Abhängigkeit zwischen Antigenkonzentration in quantitativen Referenzverfahren wie dem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder dem Westernblot und der quantitativen IHC von DAB-Färbungen besteht (Helps et al., 2012; Guirado et al., 2018). Um dennoch angesprochene Hindernisse bei der quantitativen Auswertung der DAB-Färbung zu umgehen, entwickelten Jensen et. al ein IHC-Verfahren, bei der markierte und unmarkierte sekundäre Antikörper in einem definierten Verhältnis eingesetzt werden. Das führte zu einer gepunkteten Färbung, bei der die Anzahl der Punkte pro Zelle Aufschluss über die dortige Antigenkonzentration gibt (Jensen et al., 2017).

Weiter fokussiert sich die vorliegende Studie auf TMA-basierte Forschung von IHC-Gewebe in der Hellfeldmikroskopie und hier speziell auf die Untersuchung von

Tumorzellen. Perspektivisch jedoch können DBA und entsprechende Algorithmen auch in anderen Bereichen eingesetzt werden. An dieser Stelle seien die Auswertung von Hämatoxylin & Eosin (H&E) und Immunfluoreszenz (IF) Bilddaten genannt, sowie die Untersuchung anderer Zellpopulationen wie Immunzellen.

DBA erlaubt die Extraktion von wertvollen Informationen in routinemäßigen H&E Schnitten. Martino et. al demonstrierten, dass H&E Schnitte genutzt werden können, um mit DBA proliferative Zellkompartimente in OSCC zu identifizieren. Sie berichteten, dass die Intensität der Hämatoxylin Färbung Ki-67 positive Zellpopulationen vorhersagen konnte (Martino et al., 2020). Eine andere Studie von Acs et. al etablierte einen ML-Algorithmus für H&E gefärbtes Melanomgewebe, der Tumor infiltrierende Lymphozyten beurteilt und darauf basierend eine prognostische Aussage ableiten konnte (Acs et al., 2019). Auch die IF kann ein Anwendungsgebiet von DBA sein. Studien zu multiplex IF konnten einen Algorithmus, ähnlich eines DTs nutzen, um anhand der verschiedenen Fluoreszenz Spektren, Zellpopulationen verschiedenen Klassen zuzuordnen (Viratham Pulsawatdi et al., 2020).

Die gewebsbasierte Forschung bietet den großen Vorteil, dass räumliche Informationen zur Expression von Zielantigenen erhalten bleiben, anders als bei der Durchflusszytometrie oder dem Western Blot (Acs et al., 2019). Vor allem in der Erforschung des Tumormikromilieus ist dies von großem Interesse. Dennoch bleiben bestimmte Zelltypen problematisch in der digitalen Auswertung, bspw. dendritische Zellen und Makrophagen aufgrund ihrer unregelmäßigen Form. Konventionelle DBA segmentiert den Nukleus, um hiervon ausgehend die Form des perinukleären Zytoplasmas abzuleiten. Dadurch wird die Zahl der Makrophagen und dendritischen Zellen in der Regel unterschätzt, da in der Schnittebene häufig nur Zellausläufer zu finden sind jedoch nicht die zugehörigen Nuklei (Krüger et al., 2013). Folgestudien adressierten dieses Problem und schlugen eine Pixel-basierte Segmentierung für diese Zellen vor. Für Zellen mit regelmäßiger Form z.B. CD3-positive T- Zellen wiesen beide Segmentierungsmethoden eine starke Korrelation auf. Jedoch können bei Pixel-basierter Segmentierung identifizierte Pixel keiner bestimmten Zelle zugeordnet werden, wodurch die Anzahl der Zellen mit unregelmäßiger Form teils systematisch überschätzt wird (Saylor et al., 2018).

4.2.3 Stärken

Diese Arbeit trägt zur aktuellen Forschung bei, indem sie sich auf verschiedene Tumorarchitekturen erstreckt und sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Färbungen miteinschließt. Bisherige Studien wurden meist nur an einer Kohorte durchgeführt und

umfassten nur wenige Markerproteine. Insgesamt umfasst die hier vorliegende Studie die Messwerte von 432 Patienten/-innen aufgeteilt auf vier Kohorten und fünf Färbungen. Die präsentierten Daten zeigen das aDBA in verschiedenen Szenarien eingesetzt werden kann.

Die Auswertung der Biomarkerstudien wird als besonders interessanter Punkt dieser Arbeit betrachtet. Nachdem im ersten Schritt ohne Bezug zu klinischen Daten, die Vergleichbarkeit der Messwerte überprüft wurde, diente die Auswertung der Proteinexpressionsstudien als Test für die Anwendbarkeit von aDBA. Um die Übereinstimmung zweier Verfahren festzustellen, gibt es keine allgemeingültigen Richtwerte. Dies zu beurteilen, obliegt der Einschätzung des/der Untersuchers/-in und hängt ab von der spezifischen Fragestellung (Akoglu, 2018). Für den PKK spricht man, je nachdem welche Einteilung zugrunde gelegt wird, ab 0.3 (Cohen, 1992) bzw. ab 0.6 (Chan, 2003) von einem deutlichen linearen Zusammenhang. Jedoch weisen schon J. M. Bland und D. G. Altman darauf hin, dass der PKK allein nicht ausreichend ist, zwei Messverfahren miteinander zu vergleichen (Bland und Altman, 2003). Sie entwickelten daher Bland-Altman-Diagramme. Diese geben eine gute grafische Repräsentation der Abweichungen der Messungen, müssen aber entsprechend der Fragestellung interpretiert werden. Der LKK als weiteres Maß für die Übereinstimmung weist das gleiche Problem wie der PKK auf. Wird sich an der Einteilung nach Altman et. al orientiert spricht man bereits ab 0.8 von einer großen Übereinstimmung (Altman, 1991) nach McBride erst ab 0.95 (McBride, 2005). Aufgrund mangelnder Konvention beziehungsweise zur quantitativen IHC, kann die hier vorliegende Studie zeigen, dass die Auswertung mit beiden Verfahren vergleichbare klinische Rückschlüsse erlaubt. Was nahelegt, dass eine ausreichende Übereinstimmung der Messwerte bestehen könnte.

4.2.4 Ausblick

Bei der Durchführung ist mDBA für den/die Auswertenden/-e zeitaufwendig sowie ermüdend und damit fehleranfällig. Außerdem ist ein gewisses Maß an Expertise auf dem Gebiet der histologischen Tumorpathologie erforderlich. Wie bereits erwähnt, könnte daher künftig aDBA nicht nur im Bereich der Forschung eingesetzt werden, sondern auch in der klinischen Routine und könnte damit diese nachhaltig verändern. Die ersten Schritte in diese Richtung wurden bereits getan. Williams et al. beispielsweise nutzten künstliche Intelligenz, um IHC-Präparate auszuwerten und den prädiktiven Wert der Ampiregulin- sowie der Epiregulin-Expression für eine anti-EGFR-Therapie in Kolonkarzinomen zu evaluieren. Patienten/-innen, für die der Algorithmus einen hohen PI bestimmte, profitierten eher von einer anti-EGFR-Therapie (Williams et al., 2021). Die richtige und schnelle Zuordnung von

Patienten/-innen in Therapiegruppen ist für die klinische Praxis eine äußerst relevante Fragestellung, hier könnte aDBA die momentane Diagnostik erweitern.

In der Zusammenschau hat die durch intelligente Algorithmen gestützte Bildauswertung diverse Anwendungsgebiete über die gesamte Medizin hinweg (Polan et al., 2016; Bonte et al., 2018). Es bestehen wenig Zweifel, dass die automatische Segmentierung und Klassifizierung von Bilddaten früher oder später auf breiter Ebene Einsatz finden.

4.3 Diskussion der Ergebnisse zu den Zielproteinen

Die vorliegende Studie charakterisiert immunhistochemisch die Expression von CDK7, pMED1 und CDK12 in HNSCC. Dazu wurde in TMA Form vorliegendes Tumorgewebe einer HNSCC-Kohorte, mittels DBA auf die Expression der Zielproteine untersucht.

4.3.1 Ergebnisse

4.3.1.1 CDK7 und pMED1

Im ersten Schritt konnte darlegt werden, dass eine mäßige bis hohe Korrelation zwischen CDK7- und pMED1-Expression in verschiedenen Tumorgeweben besteht. Eine Korrelation weist keine Kausalität nach, kann aber als Hinweis auf eine eventuelle funktionelle Verbindung zwischen CDK7 und pMED1 dienen (Akoglu, 2018).

Folglich besteht Grund zu der Vermutung, dass auch in HNSCC CDK7 MED1 zu einem gewissen Teil phosphoryliert, wie bereits bei Prostatakarzinomen beschrieben (ur Rasool et al., 2019).

Bei der Untersuchung des Einflusses der CDK7/pMED1-Co-Expression auf das Überleben innerhalb der HNSCC-Kohorte konnten keine signifikanten Effekte auf das Überleben festgestellt werden. Vielmehr deutete die Analyse darauf hin, dass die Prognose der Patienten/-innen weitestgehend von der CDK7-Expression bestimmt wurde und keine Abhängigkeit von der pMED1-Expression gezeigt werden konnte. Die durchgeführte multivariable Cox-Regression bestätigte dies. Die nachfolgenden Analysen beschränken sich deshalb in erster Linie auf die CDK7-Expression.

Bezüglich der Interaktion von CDK7 und MED1 ist die Studienlage begrenzt. Vor allem bei Signalwegen nukleärer Rezeptoren wird pMED1 zum Mediator-Komplex rekrutiert (Belakavadi et al., 2008). Die spezifische Rolle von pMED1 in onkologischen Prozessen in diesem Zusammenhang bleibt unklar. Sowohl für Über- als auch Unterexpression wurde über nachteilige Krankheitsverläufe bei Patienten/-innen berichtet. In Entitäten, in denen Signalwege nukleärer Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen, verhält sich pMED1 am

wahrscheinlichsten als Onkogen und ist daher mit einem schlechterem Outcome bei Prostatakarzinomen und bei Brustkrebs assoziiert (Cui et al., 2012; ur Rasool et al., 2019). Im Gegensatz dazu zeigte sich für Karzinome, in denen Signalwege nukleärer Rezeptoren von untergeordneter Bedeutung sind, wie bspw. bei Harnblasenkarzinomen (Ergebnisse der Arbeitsgruppe (Klümper et al., 2017)), eine Abnahme der MED1-Expression während der Progression des Tumors (Gade et al., 2009; Yun et al., 2011; Kim et al., 2012). Momentan mangelt es noch an Studien, welche die Rolle von nukleären Signalwegen in HNSCC detailliert beschreiben. Hinweise, dass sie eine Schlüsselrolle bei der Tumورprogression spielen, fehlen bislang (Lukits et al., 2007; Schweitzer et al., 2010).

Man könnte deshalb spekulieren, dass die CDK7 abhängige Phosphorylierung von MED1 nur eine untergeordnete Rolle auf die transkriptionellen Effekte von CDK7 in HNSCC hat. CDK7 übt unter Umständen eher seine Rolle als Onkogen über eine generelle Steigerung der globalen Transkription aus. Hier sei auf die SE getriebenen Transkriptionsprogramme verwiesen, welche besonders abhängig von CDK7 sind (Kwiatkowski et al., 2014; Nilson et al., 2015; Fisher, 2018). Eine große Anzahl von Transkriptions-assoziierten Proteinen binden an SE, was zu einer gesteigerten Transkription von abhängigen Genen führt (Fisher, 2018). Auch in HNSCC scheinen SEs eine kritische Rolle zu spielen. Eine kürzlich erschienene Studie von Dong et al. weist darauf hin, dass SEs eine entscheidende Rolle für das Überleben von HNSCC-Stammzellen spielen. Eine Störung der Transkriptionsprogramme hatte eine Eliminierung dieser Zellpopulationen zur Folge (Dong et al., 2021).

Aus den Daten der untersuchten HNSCC-Kohorte geht hervor, dass eine erhöhte CDK7-Expression zu einem signifikant kürzerem 5-JÜ und 5-JKÜ führt. Für das 5-JÜ zeigte eine multivariable Cox-Regression, dass eine starke CDK7-Expression als unabhängig von anderen bekannten Risikofaktoren, wie z.B. dem p16-Status, angesehen werden kann. Analog konnte dies ebenfalls für das 5-JKÜ nachgewiesen werden.

In der Korrelation der CDK7-Expression mit den klinisch-pathologischen Daten der Patienten/-innen zeigte sich ein Unterschied zwischen der CDK7-Expression von Patienten/-innen mit positiven bzw. negativen Fernmetastasenstatus. Hier konnte mittels aDBA eine signifikant erhöhte Expression in den Primärtumoren von Patienten/-innen, die Fernmetastasen entwickelten, festgestellt werden. Auch die mDBA wies eine höhere Expression von CDK7 bei diesen Patienten/-innen nach, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Hier lassen sich Hinweise vermuten, dass eine erhöhte CDK7-Expression auf aggressivere HNSCC-Tumore hindeuten könnte.

CDK7-Überexpression wurde über verschiedene Entitäten hinweg beobachtet und ist hier stets mit einer schlechteren Prognose und/oder einem aggressiveren Tumorphänotyp (d.h. schlechtere Differenzierung und/oder fortgeschrittenes Tumorstadium) in Zusammenhang gebracht worden. In OSCC war eine CDK7-Überexpression assoziiert mit verkürztem 5-JÜ und ebenfalls assoziiert mit einem höheren T-Stadium (Jiang et al., 2019). Ähnliche Biomarkerstudien zu Magenkarzinomen, Ösophaguskarzinomen und Ovarialkarzinomen kamen zu entsprechenden Ergebnissen und zeigten ein kürzeres Überleben, höheres Grading und fortgeschrittenere Tumore bei erhöhter CDK7-Expression (Zhang et al., 2013; Wang et al., 2016; Kim et al., 2020). Die vorliegende Studie bestätigt diese Untersuchungsergebnisse für die genutzte HNSCC-Kohorte im Hinblick auf das Überleben.

In Bezug auf verschiedene Tumorgewebe fand sich lediglich eine signifikant erniedrigte Expression von CDK7 in den Lymphknoten im Vergleich zu den Primärtumoren. Für dieses Ergebnis fand sich keine Entsprechung in der Literatur. Es wurde als Folge der Auswertung gewertet. In der mDBA bzw. auch der aDBA mussten in den Lymphknotengewebe die Tumorzellen zwischen vielen Lymphozyten erkannt werden. Was vermuten lassen könnte, dass hier einige Lymphozyten in die ROI miteingeschlossen wurden. In der visuellen Kontrolle wiesen die Lymphozyten eine niedrigere CDK7-Expression auf als die Tumorzellen, sodass in der Zusammenschau die CDK7-Expression pro Stanze als zu niedrig angegeben wurde.

Zwischen den einzelnen Primärtumorlokalisationen konnten in der hier zugrundeliegenden HNSCC-Kohorte keine signifikanten Unterschiede in der CDK7-Expression festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde auf spezielle Subgruppenanalysen verzichtet.

Interessant jedoch nur mit mDBA nachweisbar waren die Ergebnisse in Bezug auf das Immunprofil der Primärtumore und die CDK7-Expression. Vor allem wiesen immuninfiltrierte Tumore eine erhöhte CDK7-Expression auf. Darüber hinaus wurde mittels mDBA eine signifikant erhöhte CDK7-Expression bei Patienten/-innen mit einem PD-L1 TPS ≥ 20 % ermittelt.

In kleinzelligen Lungenkarzinomen führte eine Abnahme von CDK7 zu genomischer Instabilität, was eine gesteigerte Immuninfiltration des Tumors zur Folge hatte (Zhang et al., 2020a). Dies steht den Ergebnissen, die aus der oben beschriebenen HNSCC-Kohorte gewonnen wurden, entgegen. In Zellkulturexperimenten konnten synergistische Effekte von CDK7-Inhibitoren in Kombination mit einer Checkpoint-Therapie nachgewiesen werden. Diese Daten sind vom großem Interesse, da hier ein möglicher Weg aufgezeigt wurde, das

Ansprechen auf Checkpoint-Therapien bei HNSCC-Patienten/-innen zu verbessern (Zhang et al., 2020a). Kürzlich wurde von Wang et al. demonstriert, dass CDK7 über MYC-abhängige Signalkaskaden die Expression von PD-L1 in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen verstärkt. Dieser Mechanismus führt zu einem Immunescape. Die Autoren dieser Studie führen ebenfalls an, dass durch CDK7-Inhibition die Zellen für eine Checkpoint-Therapie sensibilisiert werden könnten (Wang et al., 2020). In der hier präsentierten Kohorte konnte ebenfalls eine erhöhte CDK7-Expression bei einem PD-L1 TPS $\geq$ 20% beobachtet werden. Daraus könnte geschlossen werden, dass ähnliche Signalkaskaden eventuell auch in HNSCC zu einem Immunescape führen, gerade in Anwesenheit von Tumor infiltrierenden Immunzellen.

4.3.1.2 *CDK12*

Wie CDK7 gehört auch CDK12 zu den transkriptionellen CDKs, wobei die genaue Funktion noch nicht ausreichend verstanden ist. Interessanterweise ist CDK12 v.a. in die Transkription von DDR-Genen involviert und wurde daher vor allem im Kontext zielgerichteter Therapien untersucht (Krajewska et al., 2019). CDK12-Inhibitoren sind synthetic lethal mit PARP-Inhibitoren (d.h. in der Kombination tödlich) und können darüber hinaus für eine Checkpoint-Therapie sensibilisieren (Johnson et al., 2016; Lui et al., 2018; Antonarakis et al., 2020; Li et al., 2020b). Auf der anderen Seite wurden wenige immunhistochemische Aufarbeitungen von CDK12 auf Proteinebene bezüglich der prognostischen Rolle in anderen Entitäten veröffentlicht.

Die hier durchgeführte Korrelation von CDK12-Expression und klinisch-pathologischen Daten der HNSCC-Patienten/-innen konnte nachweisen, dass vor allem Patienten/-innen mit Rezidiv eine erhöhte CDK12-Expression im Primarius aufwiesen.

Die Untersuchung der Expression von CDK12 in Primärtumoren, Fernmetastasen und Rezidiven zeigte, dass Rezidive und Fernmetastasen generell eine höhere CDK12-Expression aufwiesen als die Primärtumore. In einer gepaarten Analyse von Primärtumor und Rezidiv, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Expression in den beiden Geweben. Das führte zu der Annahme, dass HNSCC-Tumore mit hoher Expression im Primärtumor auch eine hohe Expression im späteren Verlauf im Rezidiv zeigen. Diese Analyse wurde gesondert für die verschiedenen Therapiegruppen OP, Chemotherapie und Radiotherapie durchgeführt. So sollte ausgeschlossen werden, dass es in einer Subgruppe durch den Einfluss der Therapie zu einer Änderung der Expression kam. Die durchgeführten Vergleiche blieben allesamt nicht-signifikant.

Da HNSCC-Patienten/-innen mit Rezidiv eine höhere CDK12-Expression aufwiesen, wurde die Annahme abgeleitet, dass entsprechend Patienten/-innen mit einer hohen Expression von CDK12 ein verkürztes 5-JKÜ aufweisen würden.

Um den optimalen Schwellenwert für die Einteilung der Gruppen in schwache und starke CDK12-Expression für die Überlebensanalyse zu bestimmen, wurde durch Erstellung einer ROC-Kurve die optimale Klassifikator-Schwelle ermittelt. In der folgenden Überlebensanalyse konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den daraus resultierenden Gruppen gezeigt werden. Die Gruppe mit starker CDK12-Expression wies ein schlechteres 5-JKÜ auf. Die CDK12-Expression zeigte sich in der multivariablen Cox-Regression als unabhängig von anderen bekannten Risikofaktoren.

Die bisherigen IHC-Studien zu anderen Entitäten zeigen ein heterogenes Bild zu CDK12 als prognostischen Marker.

Ähnlich zu den hier dargestellten Ergebnissen zeigte eine Studie von Thanindratarn et al. unter Chordom-Patienten/-innen eine erhöhte CDK12-Expression in Rezidiven und Fernmetastasen, was auch aus den Daten der hier untersuchten HNSCC-Kohorte hervorgeht. Auch wurde in der Studie von Thanindratarn et al. die CDK12-Expression als unabhängiger prognostischer Marker für das Überleben und das progressionsfreie Überleben beschrieben (Thanindratarn et al., 2020). Bei intakter Funktion scheint CDK12 genomische Stabilität zu vermitteln und dadurch die Akkumulation letaler Mutation in den Tumorzellen zu verhindern (Bayles et al., 2019).

Proteinexpressionsstudien zu Mamma- und Prostatakarzinomen zeigten ein ähnliches Bild. Bei CDK12-Überexpression ergab sich für die Patienten/-innen eine schlechtere Überlebensprognose (Naidoo et al., 2018; Hupe et al., 2020). Interessanterweise liegt das Gen für CDK12 in Nähe des erb-b2 Receptor Tyrosin Kinase 2 (ERBB2) Gens. Die Studie von Naidoo et. al konnte daher ebenfalls nachweisen, dass diese beiden Gene häufig eine Co-Amplifikation in Mammakarzinomen aufweisen und schließt daraus, dass bei positiven ERBB2-Status eine PARP-Therapie beim Mammakarzinom Anwendung finden könnte (Naidoo et al., 2018). Eine in-silico Analyse zeigte, dass auch in HNSCC in seltenen Fällen ERBB2 amplifiziert vorliegt (Pollock und Grandis, 2015), in diesen Fällen wurde ebenfalls CDK12 co-amplifiziert (TCGA (The Cancer Genome Atlas), HNSCC, PanCancer Atlas).

Da eine ERBB2-gerichtete Therapie auch bei Magenkarzinomen Anwendung findet, wurde der CDK12-Status hier ebenfalls von zwei unabhängigen Studien untersucht. Die Studie von Ji et al. konnte eine Überexpression in Zusammenhang mit einem kürzerem Überleben, mehr

Lymphknotenmetastasen und einem diffusen Typ nach Lauren bringen (Ji et al., 2019). Überraschenderweise kam eine andere Studie zu gegensätzlichen Ergebnissen. Hier war eine erniedrigte CDK12-Expression mit einer schlechteren Prognose und einem aggressiveren Tumorphänotypen assoziiert (Liu et al., 2020). Es bleibt zu determinieren, ob CDK12 als Onkogen oder Tumorsuppressorgen fungiert.

Gängige Hypothesen gehen davon aus, dass es durch Inhibition von CDK12 zu Defekten im DDR-Signalweg kommt. Dadurch steigt die Tumormutationslast und Neoantigene entstehen, wodurch ein Influx von Immunzellen vermittelt wird (Wu et al., 2018; Li et al., 2020a). Daher wurde hier erwartet, dass in den immuninfiltrierten HNSCC-Tumoren die niedrigste CDK12-Expression zu finden sein würde. Erstaunlicherweise präsentierten diese Tumore die höchste Expression. Die Unterschiede zwischen den Gruppen eingeteilt nach Immunprofil waren dabei nicht signifikant. Dennoch könnte hier klinische Relevanz bestehen. Die Studie Ji et al. kam bei der Untersuchung in Magenkarzinomen zu einem analogen Ergebnis. Es wurde spekuliert, dass CDK12 die Expression von CC-Chemokine Ligand 21 steigert. Dieses Chemokin vermittelt die Infiltration von T-Zellen und dendritischen Zellen (Adutler-Lieber et al., 2018; Ji et al., 2019). Von Interesse wären hier detaillierte Studien zur Charakterisierung des Immuninfiltrates und des Chemokinprofils in Abhängigkeit von der CDK12-Expression.

4.3.2 Schwächen

IHC kann zwar die Expression von Proteinen detektieren, jedoch keine Aussage über die Funktionsfähigkeit treffen. Diese können in einem Teil der Fälle auch mutiert vorliegen. Allerdings sind Alterationen des CDK12-Gens in 2.8 % und des CDK7-Gens lediglich in 0.4 % der Fälle in HNSCC nachweisbar (TCGA, HNSCC, PanCancer Atlas).

Die hier beschriebene HNSCC-Studienkohorte ist größer als viele Kohorten, auf denen bisherige Publikationen basieren. Dennoch ist auch diese Stichprobengröße ggf. zu gering, um Unterschiede bei geringen Effektstärken zu detektieren. Die durchgeführte Poweranalyse macht dies deutlich. Die Effektstärken wurden sehr konservativ geschätzt. Es ist nicht auszuschließen, dass mit einer größeren Kohorte ggf. weitere signifikante Unterschiede gefunden werden könnten. Diese müssten dann auf klinische Relevanz hin diskutiert werden.

Gemäß den Empfehlungen der REMARK sollten generell die präsentierten Ergebnisse in einer unabhängigen Kohorte validiert werden (Altman et al., 2012). Es hätte die Möglichkeit bestanden, einen Teil der Patienten/-innen von der initialen Auswertung zu exkludieren, um die Ergebnisse mit diesem Teildatensatz intern zu validieren. Es wurde sich dagegen

entschieden, um bei der begrenzten Anzahl von Patienten/-innen die Stichprobengröße nicht weiter zu verkleinern.

4.3.3 Stärken

Anders als viele bisher publizierte Studien umfasste die hier zugrunde liegende Kohorte nicht nur Gewebe der Primärtumore sondern auch der Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen und Rezidive. So konnte die Expression der ausgewählten Proteine in verschiedenen Tumorgewebearten abgebildet und untersucht werden.

Darüber hinaus wurden alle hier diskutierten Ergebnisse der IHC-Auswertung durch zwei unabhängige Programme der DBA erhoben. Andere Studien zur Expression von CDK7 und CDK12 nutzten hierfür üblicherweise ein ordinalskaliertes visuelles Scoring. Dies führte in einem Teil der Studien dazu, dass nicht deutlich wird, wie im Anschluss die Patienten/-innen für die Überlebensanalyse stratifiziert worden sind. In einer Studie wurde der Schwellenwert nach dem p-Wert im Log-Rank-Test adaptiert (Kim et al., 2020). Ohne Adjustierung kann dies falsch-positive Ergebnisse produzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde sich deshalb an Lagemaßen oder der ROC-Kurve orientiert, um keinen Bias in die Auswertung einzubringen (Altman et al., 2012).

Die hier präsentierten Ergebnisse können wichtige Hinweise für weitere Forschungshypothesen liefern. Jedoch ist die Korrelation von Expression mit klinisch-pathologischen Daten vorerst deskriptiver Natur und lässt allenfalls Spekulationen zu. Ohne funktionelle Aufarbeitung in HNSCC-Zellkultur verbietet es sich kausale Zusammenhänge zu postulieren. Die hier ermittelten Ergebnisse liefern vorerst Hinweise, um weitere Fragestellungen zu generieren. Für die Resultate der klinischen IHC-Studie gilt es im nächsten Schritt, Entsprechungen auf zellulärer Ebene zu identifizieren und die dahinterstehenden Mechanismen genauer zu verstehen.

4.3.4 Ausblick

4.3.4.1 CDK7 und pMED1

Die Inhibition von CDK7 galt lange als problematisch, da aufgrund der universellen Rolle dieses Proteins bei der Transkription eine intolerable Toxizität vermutet wurde (Kwiatkowski et al., 2014). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Tumorzellen überproportional sensibel auf eine Störung ihrer Transkriptionsprogramme reagieren (Lovén et al., 2013; Galbraith et al., 2019). Dadurch öffnet sich ein therapeutisches Fenster für CDK7-Inhibitoren. In angepasster Dosierung könnten die anti-proliferativen Effekte auf

Tumorzellen ausgenutzt werden, ohne die globale Transkription von anderen Zellen relevant zu beeinflussen (Wang et al., 2015; Fisher, 2018).

Für CDK7 besteht ein großes translationales Potenzial, da nicht nur dessen Expression prognostisch Wertigkeit besitzt, sondern es auch ein potenzielles Zielprotein einer zielgerichteten Therapie sein könnte. Im Gegensatz zu pMED1, welches in HNSCC wie bereits geschildert, wahrscheinlich weniger Bedeutung, für die von CDK7 ausgeübten Effekte hat, scheint der Transkriptionsfaktor MYC eine zentralere Rolle einzunehmen. MYC ist ein bekanntes Onkogen, welches die SE-abhängige Transkription mit reguliert (Sengupta und George, 2017). In diversen Karzinomen, darunter Ovarialkarzinome, kleinzellige Lungenkarzinome und Neuroblastome, konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition von CDK7 mit THZ1 die MYC-abhängige Transkription inhibiert wird (Chipumuro et al., 2014; Christensen et al., 2014; Zeng et al., 2018). Auch in HNSCC scheint MYC eine wichtige Rolle als Onkogen einzunehmen (Stucky et al., 2017). Die Gabe von THZ1 führte in HNSCC-Zellkulturen zu einer Modulation MYC-abhängiger Gene und verminderte folgend die Zellproliferation und induzierte Apoptose (Zhang et al., 2020b; Ge et al., 2021). Interessanterweise inhibiert THZ1 nicht nur CDK7 sondern auch CDK12 (Zeng et al., 2018).

In Anbetracht der momentan fehlenden Biomarker für eine prognostische Stratifizierung von HNSCC-Patienten/-innen könnte die CDK7-Expression wertvolle neue Informationen liefern. CDK7 in routinemäßig durchgeführte Färbungen von histologischen HNSCC-Präparaten zu inkludieren, könnte wichtige Anhaltspunkte über die Prognose für Patienten/-innen geben und auch das Nachsorgemanagement und Therapieentscheidungen mitbestimmen.

Es wäre interessant weiterzuverfolgen, ob eine Wirksamkeit von CDK7-Inhibitoren als Behandlungsmöglichkeit bei HNSCC-Patienten/-innen gegeben ist. Wie bisherige in-vitro Studien vermuten lassen, könnte ggf. eine pharmakologische Inhibition dieselben Vorteile bieten wie eine niedrige Expression (s.o.). Dann könnte eine Hemmung der Transkription durch CDK7-Inhibitoren Bestandteil künftiger therapeutischer Regime werden.

4.3.4.2 *CDK12*

Im Gegensatz zu CDK7 nimmt CDK12 nach vorliegendem Wissensstand vermutlich eine speziellere Rolle bei der Transkription ein. Das Enzym scheint tlw. selektiv die Transkription von DDR-Genen zu steuern. Defekte im DDR-Signalweg führen zu einer gesteigerten Tumormutationslast und der Entstehung von Neoantigenen, welche wiederum den Influx von Immunzellen vermitteln (Hupe et al., 2020; Li et al., 2020a, 2020b).

Gegenwärtig werden drei medikamentöse Strategien diskutiert, um diese biologische Eigenheit pharmakologisch zu nutzen. CDK12 zeigt sich abhängig von der Entität als Tumorsuppressor bzw. als Onkogen (Paculová und Kohoutek, 2017).

In der Rolle als Tumorsuppressor trägt das Enzym dazu bei die genomische Stabilität zu erhalten. Der Einsatz von PARP-Inhibitoren ist in der Tumorthherapie weit verbreitet. PARPs sind eine Gruppe von Enzymen der DNA-Reparatur. Eine Inhibition induziert Doppelstrangbrüche in der DNA (Bunting et al., 2010; Javle und Curtin, 2011). Als prädiktiver Marker für eine PARP-Inhibition werden Defekte im Homologous Recombination (HR) Signalweg angesehen, welcher diese Doppelstrangbrüche physiologischerweise reparieren würden (Szostak et al., 1983; Jasin und Rothstein, 2013; Glorieux et al., 2017). Ein klinisch häufig genutzter Marker für eben diese Defekte ist die Bestimmung des BRCA1/2, early-onset (BRCA1/2) Mutationsstatus (Farmer et al., 2005). BRCA1/2 Mutationen sind in HNSCC selten (Glorieux et al., 2017). Jedoch existieren andere Defekte des HR-Signalweges, welche die Zellen für eine anti-PARP-Therapie sensibilisieren (Bajrami et al., 2014). Subsumiert wird dies als BRCAness (Glorieux et al., 2017). Da Inhibition von CDK12 durch Hemmung der DDR-Gene einen BRCAness Phänotyp hervorrufen, ist eine duale Inhibition von PARP und CDK12 synthetic lethal für entsprechende Zellen (Bajrami et al., 2014; Johnson et al., 2016; Lui et al., 2018; Quereda et al., 2019; Ainscow et al., 2020). In high grade Ovarialkarzinomen war das CDK12-Gen eines der am häufigsten mutierten Gene, wobei die meisten Mutationen eine Loss-of-Function zur Folge hatten (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011). Betroffene Zellen reagierten empfindlicher auf eine Behandlung mit PARP-Inhibitoren (Joshi et al., 2014). PARP-Therapien wurden bereits in-vitro in HNSCC-Modellen getestet und zeigten ein gutes Ansprechen, ggf. liegt in CDK12 auch hier ein Marker vor, um die Sensibilität gegenüber oben genannten Therapien zu determinieren (Glorieux et al., 2017).

In der Rolle als Onkogen wird vermutet, dass CDK12 ähnlich wie CDK7 auch die TA mit beeinflussen kann. In diesem Fall könnte mit Inhibitoren wie THZ1 eine duale Inhibition von diesen beiden CDKs erreicht werden und Anwendung in künftigen Therapieregimen finden (Zeng et al., 2018; Mastronikolis et al., 2019).

Darüber hinaus hat CDK12 Implikationen für die Checkpoint-Therapie. Anti-PD-1-Therapien können bei einigen Patienten/-innen zu einer langfristigen Remission führen. Die genauen Gründe warum einige Patienten/-innen profitieren und andere nicht sind teilweise noch nicht geklärt (Cogdill et al., 2017). Wie im Abschnitt Therapie beschrieben, werden auch bei HNSCC Checkpoint-Inhibitoren teilweise in der Therapie eingesetzt. Allerdings

sind die Ansprechraten mit 15%-20% gering (Przybylski et al., 2018; Qiao et al., 2020). Studien zeigten, dass CDK12-Inhibition die Tumormutationslast steigert und damit die Entstehung von Neoantigen fördert. Darüber hinaus wurde bestätigt, dass CDK12-Inhibition den immunogenen Zelltod induziert. Diese Mechanismen steigern die Immunogenität des Tumors und könnten das Ansprechen auf eine anti-PD-1-Therapie verbessern, was bereits in-vitro gezeigt wurde (Wu et al., 2018; Li et al., 2020b). Für Prostatakarzinome wurde beschrieben, dass Patienten/-innen mit Mutation im CDK12-Gen aggressivere Tumore aufwiesen und eine kürzere Überlebensdauer hatten. Allerdings war auch ein besseres Ansprechen auf PD-1-Inhibitoren aufgezeigt worden (Antonarakis et al., 2020; Rescigno et al., 2021). Experimente liefern Hinweise, dass es bei CDK12-Depletion aufgrund der entstehenden Neoantigene zu einer gesteigerten Infiltration durch CD4-positive FOX-negative Zellen kommt. Diese Zellen inhibieren über PD-L1-Expression zytotoxische T-Zellen und hemmen so die Tumorimmunantwort (Rescigno et al., 2021). Hier bestehen Chancen ggf. durch duale Inhibition von PD-1 und CDK12 das Ansprechen auf anti-PD-1-Therapien zu steigern.

Künftig wäre es wichtig weitere funktionelle Untersuchungen zu CDK12 durchzuführen, um vor allem das Immuninfiltrat besser charakterisieren zu können. Weitere IHC-Studien an unabhängigen Kohorten müssten durchgeführt werden, um das Verständnis der prognostischen Rolle der CDK12-Expression auszubauen. Die noch unvollständigen Erkenntnisse spiegeln sich in den teils gegensätzlichen Ergebnissen der bisherigen Studien wider.

5 Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit hatte zwei Hauptziele. Es sollten CDK12, pMED1 und CDK7 als potenzielle Biomarker in HNSCC untersucht werden. Bereits publizierte Studien an anderen Entitäten ließen vermuten, dass die Expression dieser Proteine auch in HNSCC mit der Prognose assoziiert, sein könnten. Zudem sollte die aDBA als zeitsparende Alternative zur mDBA evaluiert werden, um zusätzlich mit einem weiteren Verfahren die Ergebnisse bezüglich der Expressionsstudien der untersuchten Proteine zu validieren.

Für die Studien zur CDK7-, pMED1- und CDK12-Expression wurde eine TMA-Kohorte aus Tumorproben von HNSCC-Patienten/-innen immunhistochemisch gefärbt. Die Auswertung der Färbungen erfolgte mittels mDBA und aDBA. Zur Etablierung der aDBA wurden die Messwerte zur IHC-Färbung zwischen aDBA und mDBA in vier Kohorten (Endometriumkarzinom-, Prostatakarzinom-, OSCC-, HNSCC-Kohorte) verglichen.

Bezugnehmend zur Eingangshypothese konnte im ersten Schritt eine starke Korrelation der Messwerte beider Verfahren der DBA in allen Kohorten demonstriert werden. Zweitens wurde eine starke Expression von CDK7 als ein unabhängiger Risikofaktor für ein verkürztes 5-JÜ und 5-JKÜ in der untersuchten HNSCC-Kohorte identifiziert. Die präsentierten Daten geben Hinweise, dass der prognostische Effekt der CDK7-Expression unabhängig zu sein scheint von der pMED1-Expression. CDK12 betreffend zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression in Primärtumoren von Patienten/-innen, die im Verlauf ein Rezidiv entwickelten. Nachfolgend konnte festgestellt werden, dass eine starke CDK12-Expression ein unabhängiger Risikofaktor für ein verkürztes 5-JKÜ war. Eindeutige Anhaltspunkte, dass die Expressionen der untersuchten Proteine in HNSCC im Zusammenhang mit dem Tumorstadium stehen, fanden sich nicht. Die genannten Ergebnisse ließen sich sowohl mit mDBA als auch mit aDBA verifizieren.

Künftig könnte aDBA in weiteren Analysen Anwendung finden und Pathologen/-innen in der Forschung zeitlich entlasten. Bezüglich CDK7 und CDK12 könnten die präsentierten Daten helfen die Prognose von Patienten/-innen mit HNSCC besser einzuschätzen und therapeutische Entscheidungen bezüglich der Aggressivität adjuvanter Therapien sowie das Nachsorgemanagement zu leiten. Ebenso sind für beide Proteine Inhibitoren in der Entwicklung und wurden bereits in präklinischen Studien getestet. V.a. vor dem Hintergrund der momentan begrenzten Therapiemöglichkeiten bei HNSCC wäre es auf lange Sicht interessant zu eruieren, ob eine pharmakologische Inhibition der Proteine die gleichen positiven prognostischen Effekte hat wie eine niedrige Expression.

6 Literaturverzeichnis

Abu-Arafeh A, Jordan H, Drummond G (2016) Reporting of method comparison studies: a review of advice, an assessment of current practice, and specific suggestions for future reports. *Br J Anaesth* 117, 569–575

Acs B, Ahmed FS, Gupta S, Wong PF, Gartrell RD, Sarin Pradhan J, Rizk EM, Gould Rothberg B, Saenger YM, Rimm DL (2019) An open source automated tumor infiltrating lymphocyte algorithm for prognosis in melanoma. *Nat Commun* 10, 5440

Adelstein D, Gillison ML, Pfister DG, Spencer S, Adkins D, Brizel DM, Burtneess B, Busse PM, Caudell JJ, Cmelak AJ, Colevas AD, Eisele DW, Fenton M, Foote RL, Gilbert J, Haddad RI, Hicks WL, Hitchcock YJ, Jimeno A, Leizman D, Lydiatt WM, Maghami E, Mell LK, Mittal BB, Pinto HA, Ridge JA, Rocco J, Rodriguez CP, Shah JP, Weber RS, Witek M, Worden F, Yom SS, Zhen W, Burns JL, Darlow SD (2017) NCCN Guidelines Insights: Head and Neck Cancers, Version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw* 15, 761–770

Adutler-Lieber S, Friedman N, Geiger B (2018) Expansion and Antitumor Cytotoxicity of T-Cells Are Augmented by Substrate-Bound CCL21 and Intercellular Adhesion Molecule 1. *Front Immunol* 9,

Aeffner F, Wilson K, Martin NT, Black JC, Hendriks CLL, Bolon B, Rudmann DG, Gianani R, Koegler SR, Krueger J, Young GD (2017) The Gold Standard Paradox in Digital Image Analysis: Manual Versus Automated Scoring as Ground Truth. *Arch Pathol Lab Med* 141, 1267–1275

Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, Fakhry C, Xie T-X, Zhang J, Wang J, Zhang N, El-Naggar AK, Jasser SA, Weinstein JN, Treviño L, Drummond JA, Muzny DM, Wu Y, Wood LD, Hruban RH, Westra WH, Koch WM, Califano JA, Gibbs RA, Sidransky D, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Wheeler DA, Kinzler KW, Myers JN (2011) Exome Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Inactivating Mutations in NOTCH1. *Science* 333, 1154–1157

Ainscow EK, Bahl A, Thompson S, Flatt L, Crepin D, Stevenson B (2020) Abstract 5692: Identification of novel CDK12 inhibitors that synergize with PARP inhibition through induction of ‘BRCAness’ phenotype. *Cancer Res* 80, 5692–5692

Akoglu H (2018) User’s guide to correlation coefficients. *Turk J Emerg Med* 18, 91–93

Ali J, Khan R, Ahmad N, Maqsood I (2012) Random Forests and Decision Trees. *Int J Comput Sci* 9, 272–278

Allen BL, Taatjes DJ (2015) The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 155–166

Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, Tavassoli M (2019) Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis* 10, 540

Altman DG (1991) *Practical Statistics for Medical Research*. 1. Aufl., 277–321, Chapman&Hall, London

- Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W, Taube SE (2012) Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): Explanation and Elaboration. *PLoS Med* 9, e1001216
- Antonarakis ES, Isaacsson Velho P, Fu W, Wang H, Agarwal N, Santos VS, Maughan BL, Pili R, Adra N, Sternberg CN, Vlachostergios PJ, Tagawa ST, Bryce AH, McNatty AL, Reichert ZR, Dreicer R, Sartor O, Lotan TL, Hussain M (2020) CDK12-Altered Prostate Cancer: Clinical Features and Therapeutic Outcomes to Standard Systemic Therapies, Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors, and PD-1 Inhibitors. *JCO Precis Oncol* 4, 370–381
- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL (2008) Head and neck cancer. *Lancet* 371, 1695–1709
- Asheer J, Jensen JS, Grønhøj C, Jakobsen KK, Buchwald C von (2020) Rate of locoregional recurrence among patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma with known HPV status: a systematic review. *Acta Oncol* 59, 1131–1136
- Bajrami I, Frankum JR, Konde A, Miller RE, Rehman FL, Brough R, Campbell J, Sims D, Rafiq R, Hooper S, Chen L, Kozarewa I, Assiotis I, Fenwick K, Natrajan R, Lord CJ, Ashworth A (2014) Genome-wide profiling of genetic synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity. *Cancer Res* 74, 287–297
- Bankhead P, Fernández JA, McArt DG, Boyle DP, Li G, Loughrey MB, Irwin GW, Harkin DP, James JA, McQuaid S, Salto-Tellez M, Hamilton PW (2018) Integrated tumor identification and automated scoring minimizes pathologist involvement and provides new insights to key biomarkers in breast cancer. *Lab Invest* 98, 15–26
- Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW (2017) QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 7, 16878
- Bayles I, Krajewska M, Pontius WD, Saiakhova A, Morrow JJ, Bartels C, Lu J, Faber ZJ, Fedorov Y, Hong ES, Karnuta JM, Rubin B, Adams DJ, George RE, Scacheri PC (2019) Ex vivo screen identifies CDK12 as a metastatic vulnerability in osteosarcoma. *J Clin Invest* 129, 4377–4392
- Behling F, Schittenhelm J (2018) Tissue microarrays - translational biomarker research in the fast lane. *Expert Rev Mol Diagn* 18, 833–835
- Belakavadi M, Pandey PK, Vijayvargia R, Fondell JD (2008) MED1 Phosphorylation Promotes Its Association with Mediator: Implications for Nuclear Receptor Signaling. *Mol Cell Biol* 28, 3932–3942
- Berg MG, Singh LN, Younis I, Liu Q, Pinto AM, Kaida D, Zhang Z, Cho S, Sherrill-Mix S, Wan L, Dreyfuss G (2012) U1 snRNP Determines mRNA Length and Regulates Isoform Expression. *Cell* 150, 53–64
- Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre J-L, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A, van Glabbeke M, European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 22931 (2004)

Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 350, 1945–1952

Bland JM, Altman DG (1999) Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 8, 135–160

Bland JM, Altman DG (2003) Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 22, 85–93

Blazek D, Kohoutek J, Bartholomeeusen K, Johansen E, Hulinkova P, Luo Z, Cimermancic P, Ule J, Peterlin BM (2011) The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes Dev* 25, 2158–2172

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48, 3282–3287

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, Youssoufian H, Rowinsky EK, Ang KK (2010) Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 11, 21–28

Bonnetain F, Bonsing B, Conroy T, Dousseau A, Glimelius B, Haustermans K, Lacaine F, Van Laethem JL, Aparicio T, Aust D, Bassi C, Berger V, Chamorey E, Chibaudel B, Dahan L, De Gramont A, Delpero JR, Derveniz C, Ducreux M, Gal J, Gerber E, Ghaneh P, Hammel P, Hendlitz A, Jooste V, Labianca R, Latouche A, Lutz M, Macarulla T, Malka D, Mauer M, Mitry E, Neoptolemos J, Pessaux P, Sauvanet A, Tabernero J, Taieb J, van Tienhoven G, Gourgou-Bourgade S, Bellera C, Mathoulin-Pélissier S, Collette L (2014) Guidelines for time-to-event end-point definitions in trials for pancreatic cancer. Results of the DATECAN initiative (Definition for the Assessment of Time-to-event End-points in CANcer trials). *Eur J Cancer* 50, 2983–2993

Bonte S, Goethals I, Van Holen R (2018) Machine learning based brain tumour segmentation on limited data using local texture and abnormality. *Comput Biol Med* 98, 39–47

Bradner JE, Hnisz D, Young RA (2017) Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell* 168, 629–643

Braun M, Kirsten R, Rupp NJ, Moch H, Fend F, Wernert N, Kristiansen G, Perner S (2013) Quantification of protein expression in cells and cellular subcompartments on immunohistochemical sections using a computer supported image analysis system. *Histol Histopathol* 28, 605–610

Bryant AK, Sojourner EJ, Vitzthum LK, Zakeri K, Shen H, Nguyen C, Murphy JD, Califano JA, Cohen EEW, Mell LK (2018) Prognostic Role of p16 in Nonoropharyngeal Head and Neck Cancer. *J Natl Cancer Inst* 110, 1393–1399

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 195, 72–79

Buchwalow I, Samoilova V, Boecker W, Tiemann M (2011) Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep* 1, 28

Bunting SF, Callén E, Wong N, Chen H-T, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng C-X, Finkel T, Nussenzweig M, Stark JM, Nussenzweig A (2010) 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141, 243–254

Cadoni G, Giraldi L, Petrelli L, Pandolfini M, Giuliani M, Paludetti G, Pastorino R, Leoncini E, Arzani D, Almadori G, Boccia S (2017) Prognostic factors in head and neck cancer: a 10-year retrospective analysis in a single-institution in Italy. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 37, 458–466

Cancer Genome Atlas Research Network (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474, 609–615

Canning M, Guo G, Yu M, Myint C, Groves MW, Byrd JK, Cui Y (2019) Heterogeneity of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Immune Landscape and Its Impact on Immunotherapy. *Front Cell Dev Biol* 7, 52

Chamoto K, Hatae R, Honjo T (2020) Current issues and perspectives in PD-1 blockade cancer immunotherapy. *Int J Clin Oncol* 25, 790–800

Chan YH (2003) Biostatistics 104: correlational analysis. *Singapore Med J* 44, 614–619

Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG (2003) Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn* 5, 73–81

Cheng S-WG, Kuzyk MA, Moradian A, Ichu T-A, Chang VC-D, Tien JF, Vollett SE, Griffith M, Marra MA, Morin GB (2012) Interaction of cyclin-dependent kinase 12/CrkRS with cyclin K1 is required for the phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 32, 4691–4704

Cheraghlou S, Yu PK, Otremba MD, Park HS, Bhatia A, Zogg CK, Mehra S, Yarbrough WG, Judson BL (2018) Treatment deintensification in human papillomavirus-positive oropharynx cancer: Outcomes from the National Cancer Data Base. *Cancer* 124, 717–726

Chin D, Boyle GM, Porceddu S, Theile DR, Parsons PG, Coman WB (2006) Head and neck cancer: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther* 6, 1111–1118

Chipumuro E, Marco E, Christensen CL, Kwiatkowski N, Zhang T, Hatheway CM, Abraham BJ, Sharma B, Yeung C, Altabef A, Perez-Atayde A, Wong K-K, Yuan G-C, Gray NS, Young RA, George RE (2014) CDK7 inhibition suppresses super-enhancer-linked oncogenic transcription in MYCN-driven cancer. *Cell* 159, 1126–1139

Chow LQM (2020) Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 382, 60–72

Christensen CL, Kwiatkowski N, Abraham BJ, Carretero J, Al-Shahrour F, Zhang T, Chipumuro E, Herter-Sprie GS, Akbay EA, Altabef A, Zhang J, Shimamura T, Capelletti M, Reibel JB, Cavanaugh JD, Gao P, Liu Y, Michaelson SR, Poulsen HS, Aref AR, Barbie DA, Bradner JE, George RE, Gray NS, Young RA, Wong K-K (2014) Targeting Transcriptional Addictions in Small Cell Lung Cancer with a Covalent CDK7 Inhibitor. *Cancer Cell* 26, 909–922

- Cogdill AP, Andrews MC, Wargo JA (2017) Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *Br J Cancer* 117, 1–7
- Cohen J (1992) A power primer. *Psychol Bull* 112, 155–159
- Collins LC, Botero ML, Schnitt SJ (2005) Bimodal frequency distribution of estrogen receptor immunohistochemical staining results in breast cancer: an analysis of 825 cases. *Am J Clin Pathol* 123, 16–20
- Cregger M, Berger AJ, Rimm DL (2006) Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. *Arch Pathol Lab Med* 130, 1026–1030
- Cui J, Germer K, Wu T, Wang J, Luo J, Wang S, Wang Q, Zhang X (2012) Cross-talk between HER2 and MED1 regulates tamoxifen resistance of human breast cancer cells. *Cancer Res* 72, 5625–5634
- Daniya T, Geetha M, Suresh Kumar K (2020) Classification and regression trees with gini index. *Adv Math: Sci J* 9, 8237–8247
- Denaro N, Merlano MC, Russi EG (2016) Follow-up in Head and Neck Cancer: Do More Does It Mean Do Better? A Systematic Review and Our Proposal Based on Our Experience. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 9, 287–297
- Diana G, Corica C (2021) Human Papilloma Virus vaccine and prevention of head and neck cancer, what is the current evidence? *Oral Oncol* 115, 105168
- Dobson L, Conway C, Hanley A, Johnson A, Costello S, O’Grady A, Connolly Y, Magee H, O’Shea D, Jeffers M, Kay E (2010) Image analysis as an adjunct to manual HER-2 immunohistochemical review: a diagnostic tool to standardize interpretation. *Histopathology* 57, 27–38
- Dong J, Li J, Li Y, Ma Z, Yu Y, Wang C-Y (2021) Transcriptional super-enhancers control cancer stemness and metastasis genes in squamous cell carcinoma. *Nat Commun* 12, 3974
- Dubbury SJ, Boutz PL, Sharp PA (2018) Cdk12 regulates DNA repair genes by suppressing intronic polyadenylation. *Nature* 564, 141–145
- Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J (2015) Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses* 7, 3863–3890
- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML (2008) Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100, 261–269
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NMB, Jackson SP, Smith GCM, Ashworth A (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917–921
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F (2019) Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 144, 1941–1953

Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Monga M, Lynch M, Geese WJ, Kopit J, Shaw JW, Gillison ML (2016) Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 375, 1856–1867

Feuchtinger A, Stiehler T, Jütting U, Marjanovic G, Lubert B, Langer R, Walch A (2015) Image analysis of immunohistochemistry is superior to visual scoring as shown for patient outcome of esophageal adenocarcinoma. *Histochem Cell Biol* 143, 1–9

Fisher RP (2012) The CDK Network: Linking Cycles of Cell Division and Gene Expression. *Genes Cancer* 3, 731–738

Fisher RP (2018) Cdk7: a kinase at the core of transcription and in the crosshairs of cancer drug discovery. *Transcription* 10, 47–56

Flanagan PM, Kelleher RJ, Sayre MH, Tschochner H, Kornberg RD (1991) A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature* 350, 436–438

Gade P, Singh AK, Roy SK, Reddy SP, Kalvakolanu DV (2009) Down regulation of the transcriptional mediator subunit Med1 contributes to the loss of expression of Metastasis associated dapk1 in human cancers and cancer cells. *Int J Cancer* 125, 1566–1574

Gaffney EF, Riegman PH, Grizzle WE, Watson PH (2018) Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotech Histochem* 93, 373–386

Galbraith MD, Bender H, Espinosa JM (2019) Therapeutic targeting of transcriptional cyclin-dependent kinases. *Transcription* 10, 118–136

Gavrielides MA, Gallas BD, Lenz P, Badano A, Hewitt SM (2011) Observer variability in the interpretation of HER2/neu immunohistochemical expression with unaided and computer-aided digital microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 135, 233–242

Ge H, Yao Y, Jiang Y, Wu X, Wang Y (2021) Pharmacological inhibition of CDK7 by THZ1 impairs tumor growth in p53-mutated HNSCC. *Oral Dis* (elektronische Veröffentlichung vor dem Druck)

Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, Tong Z, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK (2012) Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. *JAMA* 307, 693–703

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92, 709–720

Gingerich MA, Smith JD, Michmerhuizen NL, Ludwig M, Devenport S, Matovina C, Brenner C, Chinn SB (2018) A Comprehensive Review of Genetic Factors Contributing to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Development in Low-Risk, Non-Traditional Patients. *Head Neck* 40, 943–954

- Glorieux M, Dok R, Nuyts S (2017) Novel DNA targeted therapies for head and neck cancers: clinical potential and biomarkers. *Oncotarget* 8, 81662–81678
- Glover-Cutter K, Larochelle S, Erickson B, Zhang C, Shokat K, Fisher RP, Bentley DL (2009) TFIIH-Associated Cdk7 Kinase Functions in Phosphorylation of C-Terminal Domain Ser7 Residues, Promoter-Proximal Pausing, and Termination by RNA Polymerase II. *Mol Cell Biol* 29, 5455–5464
- Guirado R, Carceller H, Castillo-Gómez E, Castrén E, Nacher J (2018) Automated analysis of images for molecular quantification in immunohistochemistry. *Heliyon* 4, e00669
- Gupta T, Kannan S, Ghosh-Laskar S, Agarwal JP (2018) Systematic review and meta-analyses of intensity-modulated radiation therapy versus conventional two-dimensional and/or or three-dimensional radiotherapy in curative-intent management of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* 13, e0200137
- Ha PK, Chang SS, Glazer CA, Califano JA, Sidransky D (2009) Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. *Oral Oncol* 45, 335–339
- Han S, Kim H, Lee Y-S (2020) Double random forest. *Mach Learn* 109, 1569–1586
- zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288, F55-78
- Helps SC, Thornton E, Kleinig TJ, Manavis J, Vink R (2012) Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 20, 82–90
- Huang SH, O’Sullivan B (2017) Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 18, 40
- Hupe MC, Offermann A, Schreiber C, Merseburger AS, Perner S (2020) CDK12 upregulation and adverse correlation with tumor-associated immune cell infiltrates in prostate cancer. *J Clin Oncol* 38, 181–181
- Idel C, Ribbat-Idel J, Kuppler P, Krupar R, Offermann A, Vogel W, Rades D, Kirfel J, Wollenberg B, Perner S (2020) EVI1 as a Marker for Lymph Node Metastasis in HNSCC. *Int J Mol Sci* 21, 854
- Ivanyi P, Eggers H (2019) Immunonkologische Therapie vs. Chemotherapie – aktuelle Konzepte bei Hals-Kopf-Tumoren. *Tumor Diagn Ther* 40, 98–101
- Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N (2002) Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12293–12297
- Jagomast T, Idel C, Klapper L, Kuppler P, Offermann A, Dreyer E, Bruchhage K-L, Ribbat-Idel J, Perner S (2022a) CDK7 Predicts Worse Outcome in Head and Neck Squamous-Cell Cancer. *Cancers (Basel)* 14, 492
- Jagomast T, Idel C, Klapper L, Kuppler P, Proppe L, Beume S, Falougy M, Steller D, Hakim SG, Offermann A, Roesch MC, Bruchhage KL, Perner S, Ribbat-Idel J (2022b) Comparison of manual and automated digital image analysis systems for quantification of

cellular protein expression. *Histol Histopathol* (elektronische Veröffentlichung vor dem Druck)

Jasin M, Rothstein R (2013) Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a012740

Javle M, Curtin NJ (2011) The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br J Cancer* 105, 1114–1122

Jensen K, Krusenstjerna-Hafstrøm R, Lohse J, Petersen KH, Derand H (2017) A novel quantitative immunohistochemistry method for precise protein measurements directly in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens: analytical performance measuring HER2. *Mod Pathol* 30, 180–193

Ji J, Zhou C, Wu J, Cai Q, Shi M, Zhang H, Yu Y, Zhu Z, Zhang J (2019) Expression pattern of CDK12 protein in gastric cancer and its positive correlation with CD8⁺ cell density and CCL12 expression. *Int J Med Sci* 16, 1142–1148

Jiang L, Huang R, Wu Y, Diao P, Zhang W, Li J, Li Z, Wang Y, Cheng J, Yang J (2019) Overexpression of CDK7 is associated with unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Pathology* 51, 74–80

Jiarpinitnun C, Larbcharoensub N, Pattaranutaporn P, Chureemas T, Juengsamarn J, Trachu N, Lukerak S, Chansriwong P, Ngamphaiboon N (2020) Characteristics and Impact of HPV-Associated p16 Expression on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Thai Patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 21, 1679–1687

Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR (2020) Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 6, 1–22

Johnson SF, Cruz C, Greifenberg AK, Dust S, Stover DG, Chi D, Primack B, Cao S, Bernhardt AJ, Coulson R, Lazaro J-B, Kachupurakkal B, Sun H, Unitt C, Moreau LA, Sarosiek KA, Scaltriti M, Juric D, Baselga J, Richardson AL, Rodig SJ, D'Andrea AD, Balmaña J, Johnson N, Geyer M, Serra V, Lim E, Shapiro GI (2016) CDK12 Inhibition reverses de novo and acquired PARP Inhibitor Resistance in BRCA wild-type and mutated models of triple-negative breast cancer. *Cell Rep* 17, 2367–2381

Joshi PM, Sutor SL, Huntoon CJ, Karnitz LM (2014) Ovarian Cancer-associated Mutations Disable Catalytic Activity of CDK12, a Kinase That Promotes Homologous Recombination Repair and Resistance to Cisplatin and Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitors. *J Biol Chem* 289, 9247–9253

Kim H-J, Roh MS, Son CH, Kim AJ, Jee HJ, Song N, Kim M, Seo S-Y, Yoo YH, Yun J (2012) Loss of Med1/TRAP220 promotes the invasion and metastasis of human non-small-cell lung cancer cells by modulating the expression of metastasis-related genes. *Cancer Lett* 321, 195–202

Kim J, Cho Y-J, Ryu J-Y, Hwang I, Han HD, Ahn HJ, Kim WY, Cho H, Chung J-Y, Hewitt SM, Kim J-H, Kim B-G, Bae D-S, Choi CH, Lee J-W (2020) CDK7 is a reliable prognostic factor and novel therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 156, 211–221

- Kim S-W, Roh J, Park C-S (2016) Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med* 50, 411–418
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M (2001) Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 92, 276–284
- Klapper L, Ribbat-Idel J, Kuppler P, Paulsen F-O, Bruchhage K-L, Rades D, Offermann A, Kirfel J, Wollenberg B, Idel C, Perner S (2020) NR2F6 as a Prognostic Biomarker in HNSCC. *Int J Mol Sci* 21, 5527
- Klümper N, Syring I, Vogel W, Schmidt D, Müller SC, Ellinger J, Shaikhibrahim Z, Brägelmann J, Perner S (2017) Mediator Complex Subunit MED1 Protein Expression Is Decreased during Bladder Cancer Progression. *Front Med (Lausanne)* 4, 30
- von Knebel Doeberitz M (2002) New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 38, 2229–2242
- Ko TK, Kelly E, Pines J (2001) CrkRS: a novel conserved Cdc2-related protein kinase that colocalises with SC35 speckles. *J Cell Sci* 114, 2591–2603
- Krajewska M, Dries R, Grasseti AV, Dust S, Gao Y, Huang H, Sharma B, Day DS, Kwiatkowski N, Pomaville M, Dodd O, Chipumuro E, Zhang T, Greenleaf AL, Yuan G-C, Gray NS, Young RA, Geyer M, Gerber SA, George RE (2019) CDK12 loss in cancer cells affects DNA damage response genes through premature cleavage and polyadenylation. *Nat Commun* 10, 1757
- Krajewska M, Smith LH, Rong J, Huang X, Hyer ML, Zeps N, Iacopetta B, Linke SP, Olson AH, Reed JC, Krajewski S (2009) Image Analysis Algorithms for Immunohistochemical Assessment of Cell Death Events and Fibrosis in Tissue Sections. *J Histochem Cytochem* 57, 649–663
- Krüger JM, Wemmert C, Sternberger L, Bonnas C, Dietmann G, Gançarski P, Feuerhake F (2013) Combat or surveillance? Evaluation of the heterogeneous inflammatory breast cancer microenvironment. *J Pathol* 229, 569–578
- Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, Urba SG, Chepeha DB, Teknos TN, Eisbruch A, Tsien CI, Taylor JMG, D'Silva NJ, Yang K, Kurnit DM, Bauer JA, Bradford CR, Carey TE (2008) EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, Sex, and Smoking As Indicators of Response to Therapy and Survival in Oropharyngeal Cancer. *J Clin Oncol* 26, 3128–3137
- Kuo P, Chen MM, Decker RH, Yarbrough WG, Judson BL (2014) Hypopharyngeal cancer incidence, treatment, and survival: temporal trends in the United States. *Laryngoscope* 124, 2064–2069
- Kwiatkowski N, Zhang T, Rahl PB, Abraham BJ, Reddy J, Ficarro SB, Dastur A, Amzallag A, Ramaswamy S, Tesar B, Jenkins CR, Hannett NM, McMillin D, Sanda T, Sim T, Kim ND, Look T, Mitsiades C, Weng AP, Brown JR, Benes CH, Marto JA, Young RA, Gray NS (2014) Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature* 511, 616–620

Larochelle S, Amat R, Glover-Cutter K, Sansó M, Zhang C, Allen JJ, Shokat KM, Bentley DL, Fisher RP (2012) Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1108–1115

Larochelle S, Merrick KA, Terret M-E, Wohlbold L, Barboza NM, Zhang C, Shokat KM, Jallepalli PV, Fisher RP (2007) Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Mol Cell* 25, 839–850

Lawrence MS, Sougnez C, Lichtenstein L, Cibulskis K, Lander E, Gabriel SB, Getz G, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Bowlby R, Brooks D, Butterfield YSN, Carlsen R, Cheng D, Chu A, Dhalla N, Guin R, Holt RA, Jones SJM, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall AJ, Gordon Robertson A, Schein JE, Sipahimalani P, Tam A, Thiessen N, Wong T, Protopopov A, Santoso N, Lee S, Parfenov M, Zhang J, Mahadeshwar HS, Tang J, Ren X, Seth S, Haseley P, Zeng D, Yang L, Xu AW, Song X, Pantazi A, Bristow CA, Hadjipanayis A, Seidman J, Chin L, Park PJ, Kucherlapati R, Akbani R, Casasent T, Liu W, Lu Y, Mills G, Motter T, Weinstein J, Diao L, Wang J, Hong Fan Y, Liu J, Wang K, Todd Auman J, Balu S, Bodenheimer T, Buda E, Neil Hayes D, Hoadley KA, Hoyle AP, Jefferys SR, Jones CD, Kimes PK, Liu Y, Marron JS, Meng S, Mieczkowski PA, Mose LE, Parker JS, Perou CM, Prins JF, Roach J, Shi Y, Simons JV, Singh D, Soloway MG, Tan D, Veluvolu U, Walter V, Waring S, Wilkerson MD, Wu J, Zhao N, Cherniack AD, Hammerman PS, Tward AD, Sekhar Pedamallu C, Saksena G, Jung J, Ojesina AI, Carter SL, Zack TI, Schumacher SE, Beroukheim R, Freeman SS, Meyerson M, Cho J, Chin L, Getz G, Noble MS, DiCara D, Zhang H, Heiman DI, Gehlenborg N, Voet D, Lin P, Frazer S, Stojanov P, Liu Y, Zou L, Kim J, Sougnez C, Gabriel SB, Lawrence MS, Muzny D, Doddapaneni H, Kovar C, Reid J, Morton D, Han Y, Hale W, Chao H, Chang K, Drummond JA, Gibbs RA, Kakkar N, Wheeler D, Xi L, Ciriello G, Ladanyi M, Lee W, Ramirez R, Sander C, Shen R, Sinha R, Weinhold N, Taylor BS, Arman Aksoy B, Dresdner G, Gao J, Gross B, Jacobsen A, Reva B, Schultz N, Onur Sumer S, Sun Y, Chan TA, Morris LG, Stuart J, Benz S, Ng S, Benz C, Yau C, Baylin SB, Cope L, Danilova L, Herman JG, Bootwalla M, Maglinte DT, Laird PW, Triche T, Weisenberger DJ, Van Den Berg DJ, Agrawal N, Bishop J, Boutros PC, Bruce JP, Averett Byers L, Califano J, Carey TE, Chen Z, Cheng H, Chiosea SI, Cohen E, Diergaarde B, Marie Egloff A, El-Naggar AK, Ferris RL, Frederick MJ, Grandis JR, Guo Y, Haddad RI, Hammerman PS, Harris T, Neil Hayes D, Hui ABY, Jack Lee J, Lippman SM, Liu F-F, McHugh JB, Myers J, Kwok Shing Ng P, Perez-Ordóñez B, Pickering CR, Prystowsky M, Romkes M, Saleh AD, Sartor MA, Seethala R, Seiwert TY, Si H, Tward AD, Van Waes C, Waggott DM, Wiznerowicz M, Yarbrough WG, Zhang J, Zuo Z, Burnett K, Crain D, Gardner J, Lau K, Mallery D, Morris S, Paulauskis J, Penny R, Shelton C, Shelton T, Sherman M, Yena P, Black AD, Bowen J, Frick J, Gastier-Foster JM, Harper HA, Leraas K, Lichtenberg TM, Ramirez NC, Wise L, Zmuda E, Baboud J, Jensen MA, Kahn AB, Pihl TD, Pot DA, Srinivasan D, Walton JS, Wan Y, Burton RA, Davidsen T, Demchok JA, Eley G, Ferguson ML, Mills Shaw KR, Ozenberger BA, Sheth M, Sofia HJ, Tarnuzzer R, Wang Z, Yang L, Claude Zenklusen J, Saller C, Tarvin K, Chen C, Bollag R, Weinberger P, Golusiński W, Golusiński P, Ibbs M, Korski K, Mackiewicz A, Suchorska W, Szybiak B, Wiznerowicz M, Burnett K, The Cancer Genome Atlas Network, Genome sequencing centre: Broad Institute, Genome characterization and data analysis centres: BC Cancer Agency, Harvard Medical School/Brigham & Women's Hospital/MD Anderson Cancer Center, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, University of Kentucky, University of North Carolina at Chapel Hill, Broad Institute, Baylor College of Medicine, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, University of California Santa Cruz/Buck Institute, Johns Hopkins University/Sidney Kimmel

Comprehensive Cancer Center, University of Southern California, Disease working group, Biospecimen core resource: International Genomics Consortium, Nationwide Children's Hospital, Data coordinating centre, Project office, Tissue source sites: Analytical Biological Services, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Georgia Regents University, Greater Poland Cancer Centre, International Genomics Consortium (2015) Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517, 576–582

Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH (2018) The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 18, 269–282

Leung SCY, Nielsen TO, Zabaglo LA, Arun I, Badve SS, Bane AL, Bartlett JMS, Borgquist S, Chang MC, Dodson A, Ehinger A, Fineberg S, Focke CM, Gao D, Gown AM, Gutierrez C, Hugh JC, Kos Z, Laenkholm A-V, Mastropasqua MG, Moriya T, Nofech-Mozes S, Osborne CK, Penault-Llorca FM, Piper T, Sakatani T, Salgado R, Starczynski J, Sugie T, van der Veegt B, Viale G, Hayes DF, McShane LM, Dowsett M, International Ki67 in Breast Cancer Working Group of the Breast International Group and North American Breast Cancer Group (BIG-NABCG) (2019) Analytical validation of a standardised scoring protocol for Ki67 immunohistochemistry on breast cancer excision whole sections: an international multicentre collaboration. *Histopathology* 75, 225–235

Li K, Guo X, Mao Y, Yang M, Huang M, Xie W, Liu X, Wang D, Qiu J, Zu X (2020a) The prevalence of CDK12 alterations in Chinese cancer patients and the association with tumor mutation burden (TMB) and survival. *J Clin Oncol* 38, e13663–e13663

Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, Veness MJ, Walker DM, Morgan GJ, Rose BR (2003) Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer* 106, 553–558

Li Y, Zhang H, Li Q, Zou P, Huang X, Wu C, Tan L (2020b) CDK12/13 inhibition induces immunogenic cell death and enhances anti-PD-1 anticancer activity in breast cancer. *Cancer Lett* 495, 12–21

Liu M, Fan H, Li T, Sihong L, Qiao S, Bi J (2020) Low expression of CDK12 in gastric cancer is correlated with advanced stage and poor outcome. *Pathol Res Pract* 216, 152962

Loughrey MB, Bankhead P, Coleman HG, Hagan RS, Craig S, McCorry AMB, Gray RT, McQuaid S, Dunne PD, Hamilton PW, James JA, Salto-Tellez M (2018) Validation of the systematic scoring of immunohistochemically stained tumour tissue microarrays using QuPath digital image analysis. *Histopathology* 73, 327–338

Lovén J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, Bradner JE, Lee TI, Young RA (2013) Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 153, 320–334

Lu DW, El-Mofty SK, Wang HL (2003) Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. *Mod Pathol* 16, 692–699

Lu P, Geng J, Zhang L, Wang Y, Niu N, Fang Y, Liu F, Shi J, Zhang Z-G, Sun Y-W, Wang L-W, Tang Y, Xue J (2019) THZ1 reveals CDK7-dependent transcriptional addictions in pancreatic cancer. *Oncogene* 38, 3932–3945

- Lui GYL, Grandori C, Kemp CJ (2018) CDK12: An emerging therapeutic target for cancer. *J Clin Pathol* 71, 957–962
- Lukits J, Remenár E, Rásó E, Ladányi A, Kásler M, Tímár J (2007) Molecular identification, expression and prognostic role of estrogen- and progesterone receptors in head and neck cancer. *Int J Oncol* 30, 155–160
- Malik S, Guermah M, Yuan C-X, Wu W, Yamamura S, Roeder RG (2004) Structural and functional organization of TRAP220, the TRAP/mediator subunit that is targeted by nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 24, 8244–8254
- Martino F, Varricchio S, Russo D, Merolla F, Ilardi G, Mascolo M, dell’Aversana GO, Califano L, Toscano G, De Pietro G, Frucci M, Brancati N, Fraggetta F, Staibano S (2020) A Machine-learning Approach for the Assessment of the Proliferative Compartment of Solid Tumors on Hematoxylin-Eosin-Stained Sections. *Cancers (Basel)* 12, 1344
- Marur S, Forastiere AA (2016) Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc* 91, 386–396
- Mastronikolis N, Ragos V, Kyrodimos E, Chrysovergis A, Papanikolaou V, Mastronikolis S, Stamatelopoulos A, Tsiambas E (2019) Mechanisms of C-myc oncogenic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *J BUON* 24, 2242–2244
- Masuda M, Wakasaki T, Suzui M, Toh S, Joe AK, Weinstein IB (2010) Stat3 orchestrates tumor development and progression: the Achilles’ heel of head and neck cancers? *Curr Cancer Drug Targets* 10, 117–126
- Matkowskyj KA, Cox R, Jensen RT, Benya RV (2003) Quantitative immunohistochemistry by measuring cumulative signal strength accurately measures receptor number. *J Histochem Cytochem* 51, 205–214
- Mbonye U, Wang B, Gokulrangan G, Shi W, Yang S, Karn J (2018) Cyclin-dependent kinase 7 (CDK7)-mediated phosphorylation of the CDK9 activation loop promotes P-TEFb assembly with Tat and proviral HIV reactivation. *J Biol Chem* 293, 10009–10025
- McBride GB (2005) A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin’s concordance correlation coefficient. NIWA client report: HAM2005-062, 62
- McDermott MSJ, Sharko AC, Munie J, Kassler S, Melendez T, Lim C-U, Broude EV (2020) CDK7 Inhibition is Effective in all the Subtypes of Breast Cancer: Determinants of Response and Synergy with EGFR Inhibition. *Cells* 9, 638
- McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM (2005) REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer* 93, 387–391
- Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T, Dalby M, Mistry P, Sen M, O’Toole L, Al Booz H, Dyker K, Moleron R, Whitaker S, Brennan S, Cook A, Griffin M, Aynsley E, Rolles M, De Winton E, Chan A, Srinivasan D, Nixon I, Grumett J, Leemans CR, Buter J, Henderson J, Harrington K, McConkey C, Gray A, Dunn J, De-ESCALaTE HPV Trial Group (2019) Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 393, 51–60

- Moore EJ, Janus J, Kasperbauer J (2012) Transoral robotic surgery of the oropharynx: Clinical and anatomic considerations. *Clin Anat* 25, 135–141
- Naidoo K, Wai PT, Maguire SL, Daley F, Haider S, Kriplani D, Campbell J, Mirza H, Grigoriadis A, Tutt A, Moseley PM, Abdel-Fatah TMA, Chan SYT, Madhusudan S, Rhaka EA, Ellis IO, Lord CJ, Yuan Y, Green AR, Natrajan R (2018) Evaluation of CDK12 Protein Expression as a Potential Novel Biomarker for DNA Damage Response–Targeted Therapies in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 17, 306–315
- Negri E, Boffetta P, Berthiller J, Castellsague X, Curado MP, Maso LD, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, Lazarus P, Lence JJ, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Shangina O, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Lissowska J, Zhang Z-F, Ferro G, Brennan P, Vecchia CL, Hashibe M (2009) FAMILY HISTORY OF CANCER: POOLED ANALYSIS IN THE INTERNATIONAL HEAD AND NECK CANCER EPIDEMIOLOGY (INHANCE) CONSORTIUM. *Int J Cancer* 124, 394–401
- Nguyen-Tan PF, Zhang Q, Ang KK, Weber RS, Rosenthal DI, Soulieres D, Kim H, Silverman C, Raben A, Galloway TJ, Fortin A, Gore E, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Gillison ML, List M, Le Q-T (2014) Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 trial: long-term report of efficacy and toxicity. *J Clin Oncol* 32, 3858–3866
- Nilson KA, Guo J, Turek ME, Brogie JE, Delaney E, Luse DS, Price DH (2015) THZ1 Reveals Roles for Cdk7 in Co-transcriptional Capping and Pausing. *Mol Cell* 59, 576–587
- Oh J-M, Di C, Venters CC, Guo J, Arai C, So BR, Pinto AM, Zhang Z, Wan L, Younis I, Dreyfuss G (2017) U1 snRNP telescripting regulates a size-function-stratified human genome. *Nat Struct Mol Biol* 24, 993–999
- Ong CW, Kim LG, Kong HH, Low LY, Wang TT, Supriya S, Kathiresan M, Soong R, Salto-Tellez M (2010) Computer-assisted pathological immunohistochemistry scoring is more time-effective than conventional scoring, but provides no analytical advantage. *Histopathology* 56, 523–529
- Osazuwa-Peters N, Simpson MC, Zhao L, Boakye EA, Olomukoro SI, Deshields T, Loux TM, Varvares MA, Schootman M (2018) Suicide risk among cancer survivors: Head and neck versus other cancers. *Cancer* 124, 4072–4079
- Paculová H, Kohoutek J (2017) The emerging roles of CDK12 in tumorigenesis. *Cell Div* 12, 7
- Pai SI, Westra WH (2009) Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Annu Rev Pathol* 4, 49–70
- Patel H, Abduljabbar R, Lai C-F, Periyasamy M, Harrod A, Gemma C, Steel JH, Patel N, Busonero C, Jerjees D, Remenyi J, Smith S, Gomm JJ, Magnani L, Györfy B, Jones LJ, Fuller-Pace F, Shousha S, Buluwela L, Rakha EA, Ellis IO, Coombes RC, Ali S (2016) Expression of CDK7, Cyclin H, and MAT1 Is Elevated in Breast Cancer and Is Prognostic in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 22, 5929–5938

- Paulsen F-O, Idel C, Ribbat-Idel J, Kuppler P, Klapper L, Rades D, Bruchhage K-L, Wollenberg B, Brägelmann J, Perner S, Offermann A (2020) CDK19 as a Potential HPV-Independent Biomarker for Recurrent Disease in HNSCC. *Int J Mol Sci* 21, 5508
- Pfister DG, Spencer S, Brizel DM, Burtneß B, Busse PM, Caudell JJ, Cmelak AJ, Colevas AD, Dunphy F, Eisele DW, Gilbert J, Gillison ML, Haddad RI, Haughey BH, Hicks WL, Hitchcock YJ, Jimeno A, Kies MS, Lydiatt WM, Maghami E, Martins R, McCaffrey T, Mell LK, Mittal BB, Pinto HA, Ridge JA, Rodriguez CP, Samant S, Schuller DE, Shah JP, Weber RS, Wolf GT, Worden F, Yom SS, McMillian NR, Hughes M, National Comprehensive Cancer Network (2014) Head and neck cancers, Version 2.2014. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 12, 1454–1487
- Pignon J-P, le Maître A, Maillard E, Bourhis J, MACH-NC Collaborative Group (2009) Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 92, 4–14
- Pilarova K, Herudek J, Blazek D (2020) CDK12: cellular functions and therapeutic potential of versatile player in cancer. *NAR Cancer* 2, zcaa003
- Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM (2007) TP53 Mutations and Survival in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 357, 2552–2561
- Polan DF, Brady SL, Kaufman RA (2016) Tissue segmentation of computed tomography images using a Random Forest algorithm: a feasibility study. *Phys Med Biol* 61, 6553–6569
- Pollock NI, Grandis JR (2015) HER2 as a Therapeutic Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 21, 526–533
- Przybylski K, Majchrzak E, Weselik L, Golusiński W (2018) Immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Immune checkpoint blockade. *Otolaryngol Pol* 72, 10–16
- Pullos AN, Castilho RM, Squarize CH (2015) HPV Infection of the Head and Neck Region and Its Stem Cells. *J Dent Res* 94, 1532–1543
- Qiao X, Jiang J, Pang X, Huang M, Tang Y, Liang X, Tang Y (2020) The Evolving Landscape of PD-1/PD-L1 Pathway in Head and Neck Cancer. *Front Immunol* 11, 1721
- Quereda V, Bayle S, Vena F, Frydman SM, Monastyrskyi A, Roush WR, Duckett DR (2019) Therapeutic Targeting of CDK12/CDK13 in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Cell* 36, 545–558.e7
- Radulescu RT, Boenisch T (2007) Blocking endogenous peroxidases: a cautionary note for immunohistochemistry. *J Cell Mol Med* 11, 1419
- Ramos-Vara JA (2005) Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42, 405–426
- Ramqvist T, Dalianis T (2010) Oropharyngeal Cancer Epidemic and Human Papillomavirus. *Emerg Infect Dis* 16, 1671–1677

- Ranta P, Kinnunen I, Jouhi L, Vahlberg T, Back LJJ, Halme E, Koivunen P, Autio T, Pukkila M, Irjala H (2021) Long-term Quality of Life After Treatment of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Laryngoscope* 131, E1172–E1178
- ur Rasool R, Natesan R, Deng Q, Aras S, Lal P, Sander Effron S, Mitchell-Velasquez E, Posimo JM, Carskadon S, Baca SC, Pomerantz MM, Siddiqui J, Schwartz LE, Lee DJ, Palanisamy N, Narla G, Den RB, Freedman ML, Brady DC, Asangani IA (2019) CDK7 inhibition suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer through MED1 inactivation. *Cancer Discov* 9, 1538–1555
- Rescigno P, Gurel B, Pereira R, Crespo M, Rekowski J, Rediti M, Barrero M, Mateo J, Bianchini D, Messina C, Fenor de la Maza MD, Chandran K, Carmichael J, Guo C, Paschalis A, Sharp A, Seed G, Figueiredo I, Lambros M, Miranda S, Ferreira A, Bertan C, Riisnaes R, Porta N, Yuan W, Carreira S, de Bono JS (2021) Characterizing CDK12-Mutated Prostate Cancers. *Clin Cancer Res* 27, 566–574
- Ribbat-Idel J, Dressler FF, Krupar R, Watermann C, Paulsen F-O, Kuppler P, Klapper L, Offermann A, Wollenberg B, Rades D, Laban S, Reischl M, Bruchhage K-L, Idel C, Perner S (2021a) Performance of Different Diagnostic PD-L1 Clones in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Med (Lausanne)* 8, 640515
- Ribbat-Idel J, Perner S, Kuppler P, Klapper L, Krupar R, Watermann C, Paulsen F-O, Offermann A, Bruchhage K-L, Wollenberg B, Idel C (2021b) Immunologic „Cold“ Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck Are Associated With an Unfavorable Prognosis. *Front Med (Lausanne)* 8, 622330
- Ribeiro IP, Caramelo F, Esteves L, Menoita J, Marques F, Barroso L, Miguéis J, Melo JB, Carreira IM (2017) Genomic predictive model for recurrence and metastasis development in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep* 7, 13897
- Rimm DL (2006) What brown cannot do for you. *Nat Biotechnol* 24, 914–916
- Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, Metzger GJ, Schmechel SC (2012) Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn Pathol* 7, 42
- Ruifrok AC, Johnston DA (2001) Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 23, 291–299
- Ryu HJ, Kim EK, Cho BC, Yoon SO (2019) Characterization of head and neck squamous cell carcinoma arising in young patients: Particular focus on molecular alteration and tumor immunity. *Head & Neck* 41, 198–207
- Safari S, Baratloo A, Elfil M, Negida A (2016) Evidence Based Emergency Medicine; Part 5 Receiver Operating Curve and Area under the Curve. *Emerg (Tehran)* 4, 111–113
- Sampathi S, Acharya P, Zhao Y, Wang J, Stengel KR, Liu Q, Savona MR, Hiebert SW (2019) The CDK7 inhibitor THZ1 alters RNA polymerase dynamics at the 5' and 3' ends of genes. *Nucleic Acids Res* 47, 3921–3936
- Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC, Dimitriadou S, Liu DL, Kantheti HS, Saghafeinia S, Chakravarty D, Daian F, Gao Q, Bailey MH, Liang W-W, Foltz SM, Shmulevich I, Ding L, Heins Z, Ochoa A, Gross B, Gao J, Zhang H, Kundra R,

- Kandoth C, Bahceci I, Dervishi L, Dogrusoz U, Zhou W, Shen H, Laird PW, Way GP, Greene CS, Liang H, Xiao Y, Wang C, Iavarone A, Berger AH, Bivona TG, Lazar AJ, Hammer GD, Giordano T, Kwong LN, McArthur G, Huang C, Tward AD, Frederick MJ, McCormick F, Meyerson M, Cancer Genome Atlas Research Network, Van Allen EM, Cherniack AD, Ciriello G, Sander C, Schultz N (2018) Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* 173, 321–337.e10
- Sarica A, Cerasa A, Quattrone A (2017) Random Forest Algorithm for the Classification of Neuroimaging Data in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Front Aging Neurosci* 9, 329
- Saylor J, Ma Z, Goodridge HS, Huang F, Cress AE, Pandol SJ, Shiao SL, Vidal AC, Wu L, Nickols NG, Gertych A, Knudsen BS (2018) Spatial Mapping of Myeloid Cells and Macrophages by Multiplexed Tissue Staining. *Front Immunol* 9, 2925
- Schachter MM, Merrick KA, Larochelle S, Hirschi A, Zhang C, Shokat KM, Rubin SM, Fisher RP (2013) A Cdk7-Cdk4 T-loop phosphorylation cascade promotes G1 progression. *Mol Cell* 50, 250–260
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505
- Schweitzer A, Knauer SK, Stauber RH (2010) Nuclear receptors in head and neck cancer: current knowledge and perspectives. *Int J Cancer* 126, 801–809
- Sengupta S, George RE (2017) Super-Enhancer-Driven Transcriptional Dependencies in Cancer. *Trends Cancer* 3, 269–281
- Shi SR, Key ME, Kalra KL (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39, 741–748
- Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Huang S, Hui A, O'Sullivan B, Waldron J, Cummings B, Kim J, Ringash J, Dawson LA, Gullane P, Siu L, Gillison M, Liu F-F (2009) Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *J Clin Oncol* 27, 6213–6221
- Shiekhhattar R, Mermelstein F, Fisher RP, Drapkin R, Dynlacht B, Wessling HC, Morgan DO, Reinberg D (1995) Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH. *Nature* 374, 283–287
- Singer S, Krauss O, Keszte J, Siegl G, Papsdorf K, Severi E, Hauss J, Briest S, Dietz A, Brähler E, Kortmann R-D (2012) Predictors of emotional distress in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 34, 180–187
- Smalley Rumfield C, Roller N, Pellom ST, Schlom J, Jochems C (2020) Therapeutic Vaccines for HPV-Associated Malignancies. *Immunotargets Ther* 9, 167–200
- Soutourina J (2018) Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 262–274

Stucky A, Sedghizadeh PP, Mahabady S, Chen X, Zhang C, Zhang G, Zhang X, Zhong JF (2017) Single-cell genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 8, 73208–73218

Sturgis EM, Cinciripini PM (2007) Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 110, 1429–1435

Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25–35

Tangirala S (2020) Evaluating the Impact of GINI Index and Information Gain on Classification using Decision Tree Classifier Algorithm. *Int J Adv Comput Sci Appl* 11, 612–619

Taylor CR, Levenson RM (2006) Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 49, 411–424

Tellier M, Zaborowska J, Caizzi L, Mohammad E, Velychko T, Schwalb B, Ferrer-Vicens I, Blears D, Nojima T, Cramer P, Murphy S (2020) CDK12 globally stimulates RNA polymerase II transcription elongation and carboxyl-terminal domain phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 48, 7712–7727

Thanindratarn P, Dean DC, Feng W, Wei R, Nelson SD, Hornicek FJ, Duan Z (2020) Cyclin-dependent kinase 12 (CDK12) in chordoma: prognostic and therapeutic value. *Eur Spine J* 29, 3214–3228

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

Vigneswaran N, Williams MD (2014) Epidemiological Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 26, 123–141

Vijayvargia R, May MS, Fondell JD (2007) A coregulatory role for the mediator complex in prostate cancer cell proliferation and gene expression. *Cancer Res* 67, 4034–4041

Viratham Pulsawatdi A, Craig SG, Bingham V, McCombe K, Humphries MP, Senevirathne S, Richman SD, Quirke P, Campo L, Domingo E, Maughan TS, James JA, Salto-Tellez M (2020) A robust multiplex immunofluorescence and digital pathology workflow for the characterisation of the tumour immune microenvironment. *Mol Oncol* 14, 2384–2402

Wang H, Wang S, Tang Y-J, Chen Y, Zheng M, Tang Y, Liang X (2019a) The Double-Edged Sword—How Human Papillomaviruses Interact With Immunity in Head and Neck Cancer. *Front Immunol* 10, 653

Wang J, Li Z, Mei H, Zhang D, Wu G, Zhang T, Lin Z (2019b) Antitumor effects of a covalent cyclin-dependent kinase 7 inhibitor in colorectal cancer. *Anti-Cancer Drugs* 30, 466–474

- Wang J, Zhang R, Lin Z, Zhang S, Chen Y, Tang J, Hong J, Zhou X, Zong Y, Xu Y, Meng R, Xu S, Liu L, Zhang T, Yang K, Dong X, Wu G (2020) CDK7 inhibitor THZ1 enhances antiPD-1 therapy efficacy via the p38 α /MYC/PD-L1 signaling in non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 13, 99
- Wang Q, Li M, Zhang X, Huang H, Huang J, Ke J, Ding H, Xiao J, Shan X, Liu Q, Bao B, Yang L (2016) Upregulation of CDK7 in gastric cancer cell promotes tumor cell proliferation and predicts poor prognosis. *Exp Mol Pathol* 100, 514–521
- Wang Y, Zhang T, Kwiatkowski N, Abraham BJ, Lee TI, Xie S, Yuzugullu H, Von T, Li H, Lin Z, Stover DG, Lim E, Wang ZC, Iglehart JD, Young RA, Gray NS, Zhao JJ (2015) CDK7-dependent transcriptional addiction in triple-negative breast cancer. *Cell* 163, 174–186
- Warnakulasuriya S (2009) Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 45, 309–316
- Warth A, Stenzinger A, Andrulis M, Schlake W, Kempny G, Schirmacher P, Weichert W (2016) Individualized medicine and demographic change as determining workload factors in pathology: quo vadis? *Virchows Arch* 468, 101–108
- Watermann C, Pasternack H, Idel C, Ribbat-Idel J, Brägelmann J, Kuppler P, Offermann A, Jonigk D, Kühnel MP, Schröck A, Dreyer E, Rosero C, Nathansen J, Dubrovskaya A, Tharun L, Kirfel J, Wollenberg B, Perner S, Krupar R (2021) Recurrent HNSCC Harbor an Immunosuppressive Tumor Immune Microenvironment Suggesting Successful Tumor Immune Evasion. *Clin Cancer Res* 27, 632–644
- Weiss BG, Ihler F, Wolff HA, Schneider S, Canis M, Steiner W, Welz C (2017) Transoral laser microsurgery for treatment for hypopharyngeal cancer in 211 patients. *Head Neck* 39, 1631–1638
- Westra WH (2009) The Changing Face of Head and Neck Cancer in the 21st Century: The Impact of HPV on the Epidemiology and Pathology of Oral Cancer. *Head and Neck Pathol* 3, 78
- Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334, 124–129
- Wienecke A, Kraywinkel K (2019) Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. *Onkologie* 25, 190–200
- Williams CJM, Seligmann JF, Elliott F, Shires M, Richman SD, Brown S, Zhang L, Singh S, Pugh J, Xu X-M, Muranyi A, Guetter C, Lorsakul A, Kurkure U, Zhao Z, Martin J, Wang X, Nguyen K, Liu W-W, Yan D, West NP, Barrett JH, Barnes M, Bai I, Seymour MT, Quirke P, Shanmugam K (2021) Artificial Intelligence-Assisted Amphiregulin and Epiregulin IHC Predicts Panitumumab Benefit in RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 27, 3422–3431
- Windon MJ, D’Souza G, Rettig EM, Westra WH, van Zante A, Wang SJ, Ryan WR, Mydlarz WK, Ha PK, Miles BA, Koch W, Gourin C, Eisele DW, Fakhry C (2018) Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer* 124, 2993–2999

Wittekind C (2020) TNM Klassifikation maligner Tumoren. Korrigierter Nachdruck 2020 mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019. 8. Aufl., korrigierter Nachdruck 2020, 25–44, Wiley-VCH, Weinheim

Wu Y-M, Cieřlik M, Lonigro RJ, Vats P, Reimers MA, Cao X, Ning Y, Wang L, Kunju LP, de Sarkar N, Heath EI, Chou J, Feng FY, Nelson PS, de Bono JS, Zou W, Montgomery B, Alva A, Robinson DR, Chinnaiyan AM (2018) Inactivation of CDK12 Delineates a Distinct Immunogenic Class of Advanced Prostate Cancer. *Cell* 173, 1770–1782.e14

Yun J, Son CH, Um SJ, Kwon HC, Lee KE, Choi PJ, Roh MS (2011) A different TRAP220 expression in distinct histologic subtypes of lung adenocarcinoma and the prognostic significance. *Lung Cancer* 71, 312–318

Zeng M, Kwiatkowski NP, Zhang T, Nabat B, Xu M, Liang Y, Quan C, Wang J, Hao M, Palakurthi S, Zhou S, Zeng Q, Kirschmeier PT, Meghani K, Leggett AL, Qi J, Shapiro GI, Liu JF, Matulonis UA, Lin CY, Konstantinopoulos PA, Gray NS (2018) Targeting MYC dependency in ovarian cancer through inhibition of CDK7 and CDK12/13. *Elife* 7, e39030

Zhang H, Christensen CL, Dries R, Oser MG, Deng J, Diskin B, Li F, Pan Y, Zhang X, Yin Y, Papadopoulos E, Pyon V, Thakurdin C, Kwiatkowski N, Jani K, Rabin AR, Castro DM, Chen T, Silver H, Huang Q, Bulatovic M, Dowling CM, Sundberg B, Leggett A, Ranieri M, Han H, Li S, Yang A, Labbe KE, Almonte C, Sviderskiy VO, Quinn M, Donaghue J, Wang ES, Zhang T, He Z, Velcheti V, Hammerman PS, Freeman GJ, Bonneau R, Kaelin WG, Sutherland KD, Kersbergen A, Aguirre AJ, Yuan G-C, Rothenberg E, Miller G, Gray NS, Wong K-K (2020a) CDK7 Inhibition Potentiates Genome Instability Triggering Anti-tumor Immunity in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* 37, 37–54.e9

Zhang J, Yang X, Wang Y, Shi H, Guan C, Yao L, Huang X, Ding Z, Huang Y, Wang H, Cheng C (2013) Low expression of cyclinH and cyclin-dependent kinase 7 can decrease the proliferation of human esophageal squamous cell carcinoma. *Dig Dis Sci* 58, 2028–2037

Zhang T, Kwiatkowski N, Olson CM, Dixon-Clarke SE, Abraham BJ, Greifenberg AK, Ficarro SB, Elkins JM, Liang Y, Hannett NM, Manz T, Hao M, Bartkowiak B, Greenleaf AL, Marto JA, Geyer M, Bullock AN, Young RA, Gray NS (2016) Covalent targeting of remote cysteine residues to develop CDK12 and 13 inhibitors. *Nat Chem Biol* 12, 876–884

Zhang W, Ge H, Jiang Y, Huang R, Wu Y, Wang D, Guo S, Li S, Wang Y, Jiang H, Cheng J (2020b) Combinational therapeutic targeting of BRD4 and CDK7 synergistically induces anticancer effects in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 469, 510–523

Zhong S, Zhang Y, Yin X, Di W (2019) CDK7 inhibitor suppresses tumor progression through blocking the cell cycle at the G2/M phase and inhibiting transcriptional activity in cervical cancer. *Onco Targets Ther* 12, 2137–2147

7 Anhänge

<i>Klinisch-pathologische Parameter</i>	<i>n</i>	<i>(%)</i>
Gesamt	409	
Geschlecht		
<i>Fehlende Angabe</i>	1	
<i>weiblich</i>	92	(22.5%)
<i>männlich</i>	316	(77.5%)
Alter		
<i>Fehlende Angabe</i>	4	
<i>Mittelwert (SD)</i>	62.5 (10.5)	
<i>Spannweite</i>	29 - 90	
Alkoholkonsum		
<i>Fehlende Angabe</i>	18	
<i>nein</i>	222	(56.8%)
<i>ja</i>	169	(43.2%)
Nikotinkonsum		
<i>Fehlende Angabe</i>	27	
<i>nein</i>	48	(12.6%)
<i>ja</i>	334	(87.4%)
Packyears		
<i>Fehlende Angabe</i>	27	
<i>Mittelwert (SD)</i>	37.6 (25.7)	
<i>Spannweite</i>	0 - 160	
Karnofsky		
<i>Fehlende Angabe</i>	33	
<i>Mittelwert (SD)</i>	70.7 (27.6)	
<i>Spannweite</i>	0 - 100	
p16-Status		
<i>negativ</i>	290	(70.9%)
<i>positiv</i>	119	(29.1%)
Tumorlokalisation		
<i>Fehlende Angabe</i>	12	
<i>CUP</i>	13	(3.3%)
<i>Hypopharynx</i>	50	(12.6%)
<i>Larynx</i>	112	(28.2%)
<i>Mundhöhle</i>	87	(21.9%)
<i>Oropharynx p16-negativ</i>	63	(15.9%)
<i>Oropharynx p16-positiv</i>	72	(18.1%)
T-Stadium		
<i>Fehlende Angabe</i>	19	
<i>T(1,2)</i>	206	(52.8%)
<i>T(3,4)</i>	184	(47.2%)
M-Stadium		
<i>Fehlende Angabe</i>	1	
<i>M-</i>	353	(86.5%)
<i>M+</i>	55	(13.5%)
N-Stadium		
<i>Fehlende Angabe</i>	6	
<i>N-</i>	172	(42.7%)
<i>N+</i>	231	(57.3%)
Grading		
<i>Fehlende Angabe</i>	16	
<i>G(1,2)</i>	299	(76.1%)
<i>G(3,4)</i>	94	(23.9%)
UICC-Stadium		
<i>Fehlende Angabe</i>	4	
<i>UICC(I,II)</i>	166	(41.0%)
<i>UICC(III,IV)</i>	239	(59.0%)
Rezidiv im Verlauf		
<i>nein</i>	306	(74.8%)
<i>ja</i>	103	(25.2%)

Tabelle 12: Klinisch-pathologische Eigenschaften der HNSCC-Kohorte im Überblick. Für kategorielle Variablen sind die Häufigkeiten angegeben. Für numerische Variablen wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und die Spannweite berechnet.

Studie	Antikörper/Kohorte	n (Triplets)			Dropout
		gesamt	eingeschlossen	ausgeschlossen	
Vergleich von manueller und automatischer digitaler Bildanalyse	CDK12/HNSCC	116	108	8	6.9%
	EVII/Endometriumkarzinom	117	106	11	9.4%
	IL-6/OSCC	98	87	11	11.2%
	PSMA/Prostatakarzinom	116	109	7	6.0%
	Ki-67/Endometriumkarzinom	117	106	11	9.4%
Untersuchung der Zielproteine mittels digitaler Bildanalyse	CDK7/HNSCC	626	582	44	7.0%
	pMED1/HNSCC	626	588	38	6.1%
	CDK12/HNSCC	626	581	45	7.2%

Tabelle 13: Pro Tumorblick wurden jeweils drei Gewebestücken auf die TMAs übertragen. Wenn alle drei Stützen Färbefehler, Gewebefalten, mangelhafte Qualität des Gewebes oder einen zu geringen Anteil an Tumorgewebe aufwiesen, wurde die jeweilige Probe von der Analyse ausgeschlossen. Die HNSCC-Kohorte umfasst lediglich 409 Patienten/-innen. Allerdings sind von einigen Patienten/-innen Triplets aus verschiedenen Geweben (Primärtumor, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen, Rezidiv) vorhanden, wodurch sich die 626 Triplets erklären.

Antigen	Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung*	Inkubation primärer Antikörper
CDK7	CDK7 (MO1) Mouse mAb Cell Signaling	Maus	Monoklonal	1:500	32min
pMED1	Anti-TRAP220/MED1 (phospho T1457) antibody Abcam	Kaninchen	Polyklonal	1:100	32min
CDK12	Anti-CDK12 Antibody Sigma-Aldrich	Kaninchen	Polyklonal	1:50	32min
EVII	Evi-1 (C50E12) mAb Cell Signaling	Kaninchen	Monoklonal	1:100	48min
IL-6	Anti-IL-6 Antibody Abcam	Maus	Monoklonal	1:100	32min
PSMA	PSMA (EP192) Sigma-Aldrich	Kaninchen	Monoklonal	unverdünnt	32min
Ki67	confirm Ki-67 (Klon 30-9) Ventana, Roche	Kaninchen	Monoklonal	unverdünnt	16min

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Antikörper. (*) verdünnt mit caseinhaltiger Reagenz (Ventana Antibody Diluent with Casein, Roche)

```

//Establishing TMA Loop
def hierarchy = getCurrentHierarchy()
def TMA = hierarchy.getTMAGrid().getTMACoreList()

for (core in TMA) {

    println (core.getName())

    //Calculating the Intensity for the entire Core
    //AND the negative/positive Amount
    def TMA_intensity = 0
    def all_cells = core.getDescendantObjects()
    def negative = 0
    def positive = 0

    for (cell in all_cells) {

        //Testing if cell is a tumor cell, if yes get
        //its intensity and add it
        def cell_class = cell.getPathClass()

        if (cell_class == getPathClass("Tumor"))
            || cell_class == getPathClass("Tumor: Positive")
            || cell_class == getPathClass("Tumor: Negative")
            || cell_class == getPathClass("Tumor: 1+")
            || cell_class == getPathClass("Tumor: 2+")
            || cell_class == getPathClass("Tumor: 3+")){

            def cell_intensity = cell.getMeasurementList()
                .getMeasurementValue
                ("Nucleus: DAB OD mean")

            TMA_intensity = TMA_intensity + cell_intensity

            //Testing if cell is a negative or positive Tumor cell
            //and count cells accordingly
            if (cell_class == getPathClass("Tumor: Negative")){
                negative = negative + 1
            }else{
                positive = positive + 1
            }
        }
    }

    println("TMA whole Intensity: "+TMA_intensity)

    //Calculating the cell count of the entire core
    //Setting list and check the amount of cells
    //for each element in the list in the TMA
    def c = ["Tumor", "Tumor: Positive",
        "Tumor: Negative", "Tumor: 1+", "Tumor: 2+", "Tumor: 3+"]

    def TMA_cell_count = 0

    for (type in c){

        def cell_count = core.getDescendantObjects()
            .findAll{it.getPathClass()
                == getPathClass(type)}

        def TMA_cell_count_class = cell_count.size()

        TMA_cell_count = TMA_cell_count + TMA_cell_count_class
    }

    println ("TMA Tumor cell count: "+TMA_cell_count)

    //Dividing the Intensity by the Cell Count for average Core Intensity
    //and multiply it with Positive Index and adding both to TMA Data Table

    if (TMA_cell_count != 0) {

        average_intensity = TMA_intensity/TMA_cell_count
        print("TMA Average Intensity: "+average_intensity)
        core.getMeasurementList().putMeasurement("Intensity", average_intensity)
    }
}

```

```

positive_index = positive / (positive + negative)
print("TMA Positive Index: "+positive_index)
core.getMeasurementList().putMeasurement("Positive Index", positive_index)

expression_index = positive_index*average_intensity
print("TMA Expression Index: "+expression_index)
core.getMeasurementList().putMeasurement("Expression Index", expression_index)
}
} //end of TMA loop

```

Abbildung 19: groovy-Skript zur Berechnung des PI und der durchschnittlichen CI der Tumorzellen je Stanze. Für die Messungen der zytoplasmatischen Färbungen wurde entsprechend der Parameter "Nucleus: DAB OD mean" durch "Cytoplasm: DAB OD mean" ersetzt. Der PI wird standardmäßig von QuPath berechnet und diente hier der Validierung des Skripts.

Vergleich		Effektstärke	Stichprobengröße
Korrelation der CI von mDBA und aDBA	einzelne Zellen	r = 0.99	n = 5
Korrelation der CI von mDBA und aDBA	ROI der Triplets	r = 0.8	n = 10
Alter	≤ 63 vs. > 63	Cohen's d = 0.2	n = 788
Geschlecht	weiblich vs. männlich	Cohen's d = 0.2	n ₁ = 254, n ₂ = 873
Alkoholkonsum	nein vs. ja	Cohen's d = 0.2	n ₁ = 456, n ₂ = 347
Nikotinkonsum	nein vs. ja	Cohen's d = 0.2	n ₁ = 225, n ₂ = 1564
p16-Status	negativ vs. positiv	Cohen's d = 0.2	n ₁ = 677, n ₂ = 278
T-Stadium	T(1,2) vs. T(3,4)	Cohen's d = 0.5	n ₁ = 68, n ₂ = 61
N-Stadium	negativ vs. positiv	Cohen's d = 0.5	n ₁ = 56, n ₂ = 76
M-Stadium	negativ vs. positiv	Cohen's d = 0.5	n ₁ = 236, n ₂ = 37
UICC-Stadium	UICC(I,II) vs. UICC(III,IV)	Cohen's d = 0.5	n ₁ = 55, n ₂ = 78
Grading	G(1,2) vs. G(3,4)	Cohen's d = 0.5	n ₁ = 134, n ₂ = 42
Rezidiv im Verlauf	nein vs. ja	Cohen's d = 0.5	n ₁ = 127, n ₂ = 43
TPS-Gruppen	≥ 20% vs. < 20%	Cohen's d = 0.5	n ₁ = 62, n ₂ = 67
Lokalisationen	Oropharynx p16-positiv vs. Oropharynx vs. p16-negativ vs. Hypopharynx vs. Larynx vs. Mundhöhle	f = 0.1	n = 1199
	Primarius vs. Lymphknotenmetastasen vs. Fernmetastasen vs. Rezidive	f = 0.25	n = 179
Immunprofil	Hot vs. Cold vs. Excluded	f = 0.25	n = 158
5-JÜ	schwache vs. starke Expression	HR = 2	n = 66
5-JKÜ	schwache vs. starke Expression	HR = 2	n = 66

Tabelle 15: Es wurden die notwendigen Stichprobengrößen bestimmt, um eine Power von mindestens 80% zu erreichen. Die Effektstärke wurde entsprechend verfügbarer Literatur eingeschätzt (s. Einleitung). Da zu den Merkmalen Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum, p16-Status und Expressionen für verschiedene Tumorklassifikationen keine Daten vorlagen, wurde konservativ von einer geringen Effektstärke ausgegangen, was die große Stichprobengröße erklärt. Für Merkmale, die auf eine aggressivere Tumorbiologie schließen lassen wie T-, N-, M-, UICC-Stadium, und Grading wurde entsprechend der Literatur von einer mittleren Effektstärke ausgegangen. Alle Stichprobengrößen wurden für parametrische Tests berechnet. Zwar wurden für die Vergleiche zur CDK12- und pMED1-Expression nicht-parametrische Tests verwendet, um hier aber ein einheitliches Maß der Effektstärke zu haben, wurde sich an den Stichprobengrößen für die parametrischen Tests orientiert. Für die Log-Rank-Tests der Überlebensanalysen wurden berichtete HRs aus vorherigen Studien zur Schätzung der Effektstärke genutzt und schlussendlich ein konservativer Schätzer von HR = 2 gewählt.

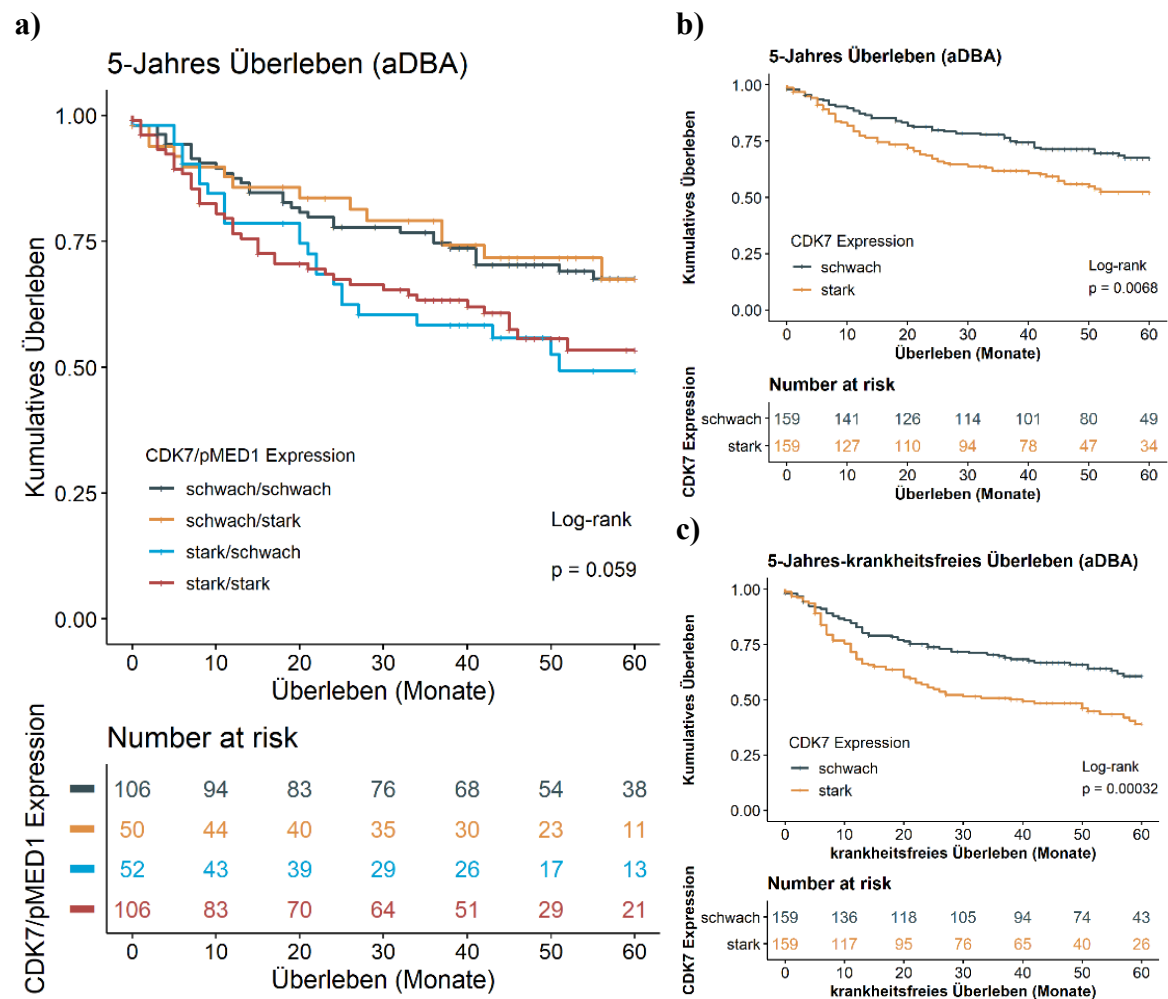


Abbildung 20: Überlebensanalyse zur **a)** CDK7/pMED1 Co-Expression und **b)** bzw. **c)** CDK7-Expression in der aDBA. Es zeigen sich analoge Kurvenverläufe zur mDBA in der Darstellung nach Kaplan-Meier.

a)

Klinische Parameter	Gesamt	CDK7-Expressionsgruppen					
		mDBA			aDBA		
		schwach	stark	p	schwach	stark	p
n	318	159	159		159	159	
Geschlecht				0.588			0.417
weiblich	37 (23.3%)	33 (20.8%)	34 (21.2%)		32 (20.1%)	38 (23.9%)	
männlich	122 (76.7%)	126 (79.2%)	126 (78.8%)		127 (79.9%)	121 (76.1%)	
Alter				0.505			0.809
Fehlende Angabe	0	2	2		0	2	
≤ 63 Jahre	66 (41.5%)	71 (45.2%)	72 (45.6%)		70 (44.0%)	67 (42.7%)	
> 63 Jahre	93 (58.5%)	86 (54.8%)	86 (54.4%)		89 (56.0%)	90 (57.3%)	
Alkoholkonsum				0.311			0.215
Fehlende Angabe	2	4	4		2	4	
Nein	92 (58.6%)	82 (52.9%)	83 (53.2%)		93 (59.2%)	81 (52.3%)	
Ja	65 (41.4%)	73 (47.1%)	73 (46.8%)		64 (40.8%)	74 (47.7%)	
Nikotinkonsum				0.777			0.968
Fehlende Angabe	8	4	4		7	5	
Nein	16 (10.6%)	18 (11.6%)	18 (11.5%)		17 (11.2%)	17 (11.0%)	
Ja	135 (89.4%)	137 (88.4%)	138 (88.5%)		135 (88.8%)	137 (89.0%)	
p16 Status				0.898			0.898
negativ	118 (74.2%)	117 (73.6%)	117 (73.1%)		117 (73.6%)	118 (74.2%)	
positiv	41 (25.8%)	42 (26.4%)	43 (26.9%)		42 (26.4%)	41 (25.8%)	
T Stadium				0.865			0.865
Fehlende Angabe	1	0	0		1	0	
T(1,2)	82 (51.9%)	81 (50.9%)	82 (51.2%)		82 (51.9%)	81 (50.9%)	
T(3,4)	76 (48.1%)	78 (49.1%)	78 (48.8%)		76 (48.1%)	78 (49.1%)	
N Stadium				0.366			0.258
Fehlende Angabe	1	1	1		1	1	
N-	75 (47.5%)	67 (42.4%)	67 (42.1%)		76 (48.1%)	66 (41.8%)	
N+	83 (52.5%)	91 (57.6%)	92 (57.9%)		82 (51.9%)	92 (58.2%)	
M Stadium				0.223			0.025
Fehlende Angabe	0	1	1		0	1	
Nein	143 (89.9%)	135 (85.4%)	135 (84.9%)		146 (91.8%)	132 (83.5%)	
Ja	16 (10.1%)	23 (14.6%)	24 (15.1%)		13 (8.2%)	26 (16.5%)	
UICC-Stadium				0.565			0.73
UICC(I,II)	59 (37.1%)	64 (40.3%)	65 (40.6%)		60 (37.7%)	63 (39.6%)	
UICC(III,IV)	100 (62.9%)	95 (59.7%)	95 (59.4%)		99 (62.3%)	96 (60.4%)	
Grading				0.787			1
G(1,2)	123 (77.4%)	125 (78.6%)	125 (78.1%)		124 (78.0%)	124 (78.0%)	
G(3,4)	36 (22.6%)	34 (21.4%)	35 (21.9%)		35 (22.0%)	35 (22.0%)	

b)

Klinische Parameter	Gesamt	CDK12-Expressionsgruppen					
		mDBA			aDBA		
		schwach	stark	p	schwach	stark	p
n	317	156	161		156	161	
Geschlecht				0.594			0.135
weiblich	69 (21.8%)	32 (20.5%)	37 (23.0%)		28 (17.9%)	40 (24.8%)	
männlich	248 (78.2%)	124 (79.5%)	124 (77.0%)		128 (82.1%)	121 (75.2%)	
Alter				0.241			0.29
Fehlende Angabe	2	0	2		0	2	
≤ 63 Jahre	139 (44.1%)	74 (47.4%)	65 (40.9%)		74 (47.4%)	66 (41.5%)	
> 63 Jahre	176 (55.9%)	82 (52.6%)	94 (59.1%)		82 (52.6%)	93 (58.5%)	
Alkoholkonsum				0.012			0.053
Fehlende Angabe	6	4	2		4	2	
Nein	174 (55.9%)	96 (63.2%)	78 (49.1%)		94 (61.8%)	81 (50.9%)	
Ja	137 (44.1%)	56 (36.8%)	81 (50.9%)		58 (38.2%)	78 (49.1%)	
Nikotinkonsum				0.341			0.585
Fehlende Angabe	12	9	3		8	4	
Nein	34 (11.1%)	19 (12.9%)	15 (9.5%)		18 (12.2%)	16 (10.2%)	
Ja	271 (88.9%)	128 (87.1%)	143 (90.5%)		130 (87.8%)	141 (89.8%)	
p16 Status				0.114			0.971
negativ	236 (74.4%)	110 (70.5%)	126 (78.3%)		116 (74.4%)	120 (74.5%)	
positiv	81 (25.6%)	46 (29.5%)	35 (21.7%)		40 (25.6%)	41 (25.5%)	
T Stadium				0.368			0.735
Fehlende Angabe	1	0	1		0	1	
T(1,2)	158 (50.0%)	82 (52.6%)	76 (47.5%)		76 (48.7%)	81 (50.6%)	
T(3,4)	158 (50.0%)	74 (47.4%)	84 (52.5%)		80 (51.3%)	79 (49.4%)	
N Stadium				0.318			0.268
Fehlende Angabe	2	1	1		1	1	
N-	139 (44.1%)	64 (41.3%)	75 (46.9%)		64 (41.3%)	76 (47.5%)	
N+	176 (55.9%)	91 (58.7%)	85 (53.1%)		91 (58.7%)	84 (52.5%)	
M Stadium				0.108			0.205
Fehlende Angabe	1	0	1		0	1	
Nein	276 (87.3%)	141 (90.4%)	135 (84.4%)		140 (89.7%)	136 (85.0%)	
Ja	40 (12.7%)	15 (9.6%)	25 (15.6%)		16 (10.3%)	24 (15.0%)	
UICC-Stadium				0.739			0.29
UICC(I,II)	119 (37.5%)	60 (38.5%)	59 (36.6%)		54 (34.6%)	65 (40.4%)	
UICC(III,IV)	198 (62.5%)	96 (61.5%)	102 (63.4%)		102 (65.4%)	96 (59.6%)	
Grading				0.163			0.051
G(1,2)	252 (79.5%)	119 (76.3%)	133 (82.6%)		117 (75.0%)	135 (83.9%)	
G(3,4)	65 (20.5%)	37 (23.7%)	28 (17.4%)		39 (25.0%)	26 (16.1%)	

Tabelle 16: Aufstellung der klinischen Charakteristika, der verglichen Gruppen in der Überlebensanalyse für **a)** die CDK7-Expression und **b)** die CDK12-Expression. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022a)

<i>pMED1</i>								
Klinische Parameter			<i>mDBA</i>			<i>aDBA</i>		
		<i>n</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Median</i>	<i>p</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Median</i>	<i>p</i>
Geschlecht	<i>weiblich</i>	73	0.25	0.23	0.15	0.19	0.18	0.05
	<i>männlich</i>	260	0.23	0.20		0.17	0.14	
Alter	<i>≤ 63 Jahre</i>	166	0.22	0.19	0.13	0.16	0.14	0.12
	<i>> 63 Jahre</i>	166	0.24	0.22		0.18	0.16	
Alkoholkonsum	<i>nein</i>	180	0.22	0.20	0.11	0.16	0.13	0.12
	<i>ja</i>	142	0.24	0.22		0.18	0.16	
Nikotinkonsum	<i>nein</i>	36	0.23	0.21	0.63	0.18	0.18	0.95
	<i>ja</i>	280	0.23	0.21		0.17	0.15	
p16-Status	<i>negativ</i>	247	0.23	0.20	0.4	0.17	0.14	0.44
	<i>positiv</i>	87	0.25	0.23		0.18	0.16	
T-Stadium	<i>T(1,2)</i>	169	0.24	0.23	0.16	0.18	0.17	0.10
	<i>T(3,4)</i>	163	0.23	0.19		0.17	0.12	
N-Stadium	<i>N-</i>	150	0.22	0.21	0.05	0.16	0.14	0.12
	<i>N+</i>	182	0.25	0.22		0.18	0.15	
M-Stadium	<i>M-</i>	289	0.23	0.21	0.82	0.17	0.15	0.58
	<i>M+</i>	44	0.23	0.20		0.17	0.12	
UICC-Stadium	<i>UICC(I,II)</i>	128	0.24	0.23	0.14	0.18	0.17	0.09
	<i>UICC(III,IV)</i>	205	0.23	0.19		0.17	0.12	
Grading	<i>G(1,2)</i>	258	0.23	0.21	0.63	0.17	0.15	0.91
	<i>G(3,4)</i>	73	0.24	0.21		0.17	0.15	
Rezidiv im Verlauf	<i>nein</i>	259	0.24	0.21	0.42	0.18	0.15	0.23
	<i>ja</i>	75	0.22	0.22		0.16	0.14	

Tabelle 17: Übersicht des Vergleichs der *pMED1*-Expression in Primärtumoren, in Abhängigkeit von verschiedenen klinisch-pathologischen Charakteristika der HNSCC-Kohorte. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

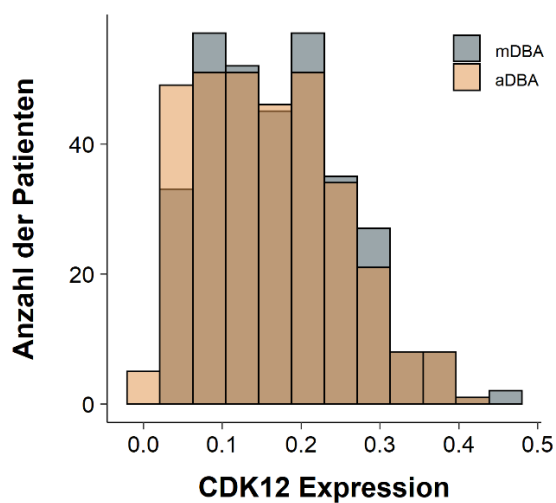
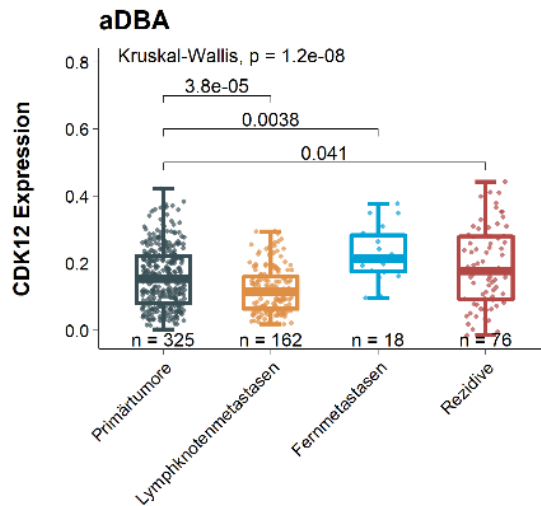


Abbildung 21: Histogramm zur Darstellung der Verteilung der Messwerte der CDK12-Expression in den Primärtumoren. Es zeigte sich eine Verteilung mit zwei Gipfeln. Die Auswertungsmodalität ist farblich aufgeschlüsselt. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)

a)



b)

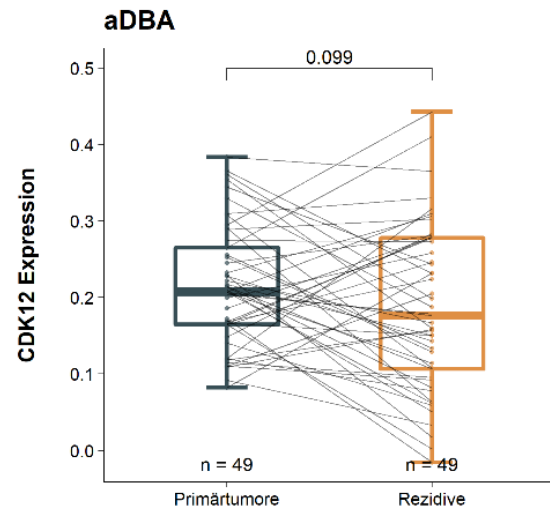


Abbildung 22: *a) Vergleich der CDK12-Expression zwischen verschiedenen Tumorgeweben. Insbesondere Fernmetastasen und Rezidive wiesen analog zur Auswertung in der mDBA eine signifikant erhöhte CDK12-Expression auf, verglichen mit den Primärtumoren. b) Ein gepaarter Vergleich der Rezidive mit den Primärtumoren zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CDK12. (adaptiert nach Jagomast et al., 2022b)*

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die mich während der Arbeit an der Promotion unterstützt haben. Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Perner recht herzlich bedanken. Er hat mir ein sehr interessantes Thema überlassen und mir darüber hinaus eine hervorragende Integration in das Forschungsteam ermöglicht. So war es mir möglich tiefe Einblicke in die universitäre Forschung zu erhalten, am wissenschaftlichen Austausch bei Labmeetings teilnehmen zu können und mich in einer vertrauensvollen Atmosphäre einbringen zu können. Besonders die regelmäßigen Gespräche und Anregungen waren für mich sehr hilfreich. Mein Dank gilt zudem Dr. Christian Idel und Dr. Julika Ribbat-Idel für die großartige Einarbeitung, die kontinuierliche Unterstützung, den direkten fachlichen Austausch, die konstruktiven Rückmeldungen bei auftretenden Problemen sowie das Korrekturlesen der Publikationen - aber vor allem auch für das freundschaftliche Miteinander in der Arbeitsgruppe. Für die Möglichkeit der Mitwirkung auch an anderen Projekten in der Pathologie und die Chance gewonnen Erkenntnisse aus der eigenen Forschung auf neue Forschungsfragen übertragen zu können, spreche ich auch Dr. Christiane Kämpers meinen Dank aus. Für die Einführung und Unterstützung von Eva Dreyer im Bereich Immunhistologie möchte ich mich ebenfalls bedanken. All das hat mir einen sehr guten Start in die Forschungsarbeit ermöglicht, für den ich mich herzlich bedanken möchte. Neben all der Unterstützung aus der Arbeitsgruppe und dem Institut, bedanke ich mich außerdem bei meinen Freunden für die aufbauenden Worte sowie die notwendige Ablenkung, um neue Kräfte zu sammeln. Auch meinen Eltern gilt meine Dankbarkeit, sie haben mich während meines ganzen Studiums unterstützt und mir geholfen meine Ziele zu erreichen.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wird an dieser Stelle nicht veröffentlicht.

10 Publikationsliste

Ein Teil der Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits im Jahr 2022 in international anerkannten Fachzeitschriften nach Begutachtung in Peer-Review-Verfahren veröffentlicht:

Tobias Jagomast, Christian Idel, Luise Klapper, Patrick Kuppler, Louisa Proppe, Sophie Beume, Mohamed Falougy, Daniel Steller, Samer Hakim, Anne Offermann, Marie Christine Roesch, Karl-Ludwig Bruchhage, Sven Perner, Julika Ribbat-Idel
Comparison of manual and automated digital image analysis systems for quantification of cellular protein expression

Histology and Histopathology. 2022 Feb 11;18434 (Jagomast et al., 2022b)

Tobias Jagomast, Christian Idel, Luise Klapper, Patrick Kuppler, Anne Offermann, Eva Dreyer, Karl-Ludwig Bruchhage, Julika Ribbat-Idel, Sven Perner
CDK7 Predicts Worse Outcome in Head and Neck Squamous-Cell Cancer
Cancers. 2022 Jan 14;3:492 (Jagomast et al., 2022a)