
Aus der
**Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Canis

**Das Kopf-Hals-Karzinom – Neues aus klinischer Diagnostik, Prognostik und
regenerativer Medizin**



Kumulative Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia Legendi in der
Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

vorgelegt von
Dr. med. Kariem-Noureldin Sharaf
aus Hamburg

2022

Meiner Familie

*«Denn die Summe unsres Lebens
Sind die Stunden, wo wir lieben. »*

Wilhelm Busch (1832 - 1908)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zusammenfassung der Fragestellungen	3
3	Betrachtung der Teilprojekte.....	4
3.1	Arbeiten zur HPV-Diagnostik in Mundhöhle und Rachen	4
3.2	Arbeiten aus der Yale-Kooperation mit Radiomics/Machine Learning in HNSCC ..	6
3.3	Arbeiten zu CSC-Markern in HNSCC	12
3.4	Arbeiten zur regenerativen Medizin bei HNSCC.....	17
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	21
5	Literaturverzeichnis.....	22
6	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	26
6.1	Abbildungen	26
6.2	Bildrechte	27
6.3	Tabellen	28
7	Danksagung	29
8	Schriftenverzeichnis der zugrundeliegenden Originalarbeiten	30
9	Anhänge (zugrundeliegende Originalarbeiten)	31

1 Einleitung

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit (1). Zu den klassischen Risikofaktoren des HNSCC zählen eine längere Exposition gegenüber irritativen, potentiell mutagenen Noxen wie Zigarettenrauchen, Alkoholabusus, Betelnuss-Konsum ebenso wie eine persistierende Infektion der Mund- und Rachenschleimhaut mit Hochrisiko-Typen von Humanen Papilloma Viren (HPV) (2).

Der Anteil der HPV-assoziierten HNSCC hat in den vergangenen Jahren in Deutschland und weltweit zugenommen (3-5). Die Bestimmung des HPV-Status hat große Relevanz, da die Prognose HPV-assoziiierter HNSCC des Mundrachens als günstiger gilt (6, 7). Dies wird aufgrund einer andersartigen Tumorbilogie und einem besseren Ansprechen der Tumorzellen auf Radio- beziehungsweise Radiochemotherapie begründet (8, 9).

Während die Entstehung HPV-assoziiierter Tumore über eine sexuelle Übertragung und persistierende Infektion mit Hochrisiko-HPV-Typen pathogenetisch gesichert erscheint (10), ist der Ansteckungsweg und die Prävalenz einer persistierenden HPV-Infektion als Vorläufer einer HPV-assoziierten Tumorerkrankung im Kopf-Hals-Bereich weiter umstritten (11, 12). Eine Fragestellung des Habilitationsprojekts war deshalb der Versuch eines HPV-DNA-Nachweises durch oropharyngeale Bürstenabstriche sowie Mundspülungen bei PatientInnen mit HPV-assoziierten HNSCC zur Frage der Sensitivität und Spezifität dieser Testverfahren. Daneben sollte auch die Prävalenz einer persistierenden oropharyngealen HPV-Infektion bei Sexualpartnern evaluiert werden, deren Partnerinnen eine nachgewiesene HPV-Infektion im Bereich des Gebärmutterhalses aufweisen.

Zu den nicht-invasiven diagnostischen Untersuchungen bei HNSCC zählen bildgebende Verfahren, die beispielsweise zur klinischen TNM-Stratifizierung, also zur lokalen Ausbreitung der Tumorerkrankung beziehungsweise Metastasen in lokoregionären Lymphknoten oder entfernten Organen herangezogen werden. Eine der Modalitäten, die für dieses so genannte „Staging“ des HNSCC genutzt werden, ist die PET-CT-Bildgebung, bei der unter anderem Aspekte der Kontrastierung und Stoffwechselaktivität in den PET-Sequenzen mit unter anderem morphologischen Aspekten aus den CT-Sequenzen verknüpft werden (13-15). Beide Modalitäten enthalten zahlreiche bildbezogene Parameter, die nur teilweise dem menschlichen Auge und Verarbeitungsvermögen zugänglich sind und als *radiomic features* bezeichnet werden (16).

Die systematische Erfassung von *radiomic features* wird als *radiomics* bezeichnet und gilt als zukunftssträchtiges Forschungsfeld in der Medizin (15, 16). Es wird postuliert, dass lernende Computer-Algorithmen (*machine learning*) diese *radiomics* wiederum auswerten und größere Muster oder Zusammenhänge in den umfangreichen Bilddatensätzen erkennen könnten (17). Im Rahmen einer Kooperation mit der Neuroradiology Section der Yale School of Medicine in New Haven, Connecticut sollten im Rahmen des Habilitationsprojekts verschiedene Fragestellungen zu PET-CT radiomics bei HNSCC mittels *machine learning*-Ansätzen beantwortet werden. Als Teilprojekte ergaben sich beispielsweise die Fragen, ob auf Basis dieser Ansätze der HPV-Status von HNSCC vorhergesagt oder die Vorhersagbarkeit der Prognose einer HNSCC-Erkrankung verbessert werden kann.

Auch molekulare Marker spielen bei der Prognose eines HNSCC eine große Rolle. So hat der HPV-Status, der häufig über den immunhistochemischen Nachweis des p16-Proteins bestimmt wird (18, 19), wie bereits beschrieben eine herausgestellte Rolle und mündete in der Loslösung der HPV-assoziierten oropharyngealen HNSCC in eine eigene TNM-Klassifikation in der 8. Version der UICC-Systematik (9, 20, 21). Die Identifikation weiterer molekularer Marker gilt als wichtig, um im Sinne der Präzisionsmedizin die Möglichkeiten zur HNSCC-Behandlung zu verbessern (22). Als besondere Herausforderung gelten Krebsstammzellen (cancer stem cells, CSC), welche als „schlafende“ Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften gesehen und sowohl für eine Therapieresistenz gegenüber nicht-chirurgischen Verfahren wie einer Chemotherapie als auch Rezidive eines HNSCC verantwortlich gemacht werden (23, 24). Im Rahmen des Habilitationsprojekts sollten verschiedene immunhistochemische CSC-Marker hinsichtlich der Prognose bei HNSCC-Erkrankungen und ihrer Expression in verschiedenen Geweben des Kopf-Hals-Bereichs ausgewertet werden.

Schließlich sollten die Möglichkeiten regenerativer Ansätze zur Abmilderung oder Verhinderung von möglichen Langzeitfolgen der HNSCC-Erkrankung und deren Therapie evaluiert werden. Eine etablierte Methode aus diesem Spektrum der regenerativen Medizin ist die Applikation von Eigenfett, beispielsweise zur Augmentation von Narben oder Substanzdefekten (25-27). Im Rahmen des Habilitationsprojekts wurden die Zusammensetzung von Eigenfetttransplantaten nach Entnahme durch Lipoaspiration genauer untersucht. Hierbei bestand ein besonderer Fokus auf der Charakterisierung von Fettstammzellen. In einem weiteren Teilprojekt wurden dann Interaktionen von Fettstammzellen mit HNSCC untersucht.

2 Zusammenfassung der Fragestellungen

Im Rahmen des Habilitationsprojekts sollen neue Aspekte der klinischen Diagnostik, Prognostik und regenerativen Medizin bei HNSCC aus verschiedenen Perspektiven betrachtet werden und sind folgenden Teilprojekten und Themenfeldern zugeordnet:

1. HPV-Diagnostik in Mundhöhle und Rachen: Wie hoch ist die Inzidenz von oralen beziehungsweise oropharyngealen HPV-Infektionen bei Sexualpartnern von gynäkologischen Patientinnen mit nachgewiesener HPV-Infektion der Cervix uteri? Lässt sich HPV-DNA in Mundspülungen beziehungsweise oropharyngealen Bürstenabstrichen von PatientInnen mit HPV-assoziiertem Oropharynx-Karzinom nachweisen?
2. Radiomics/Machine Learning in HNSCC: Kann der HPV-Status eines Oropharynx-Karzinoms mittels Machine Learning auf Basis von PET/CT Radiomics vorhergesagt werden? Kann Machine Learning auf Basis von PET/CT Radiomics das Überleben beziehungsweise ein lokoregionäres Rezidiv eines Oropharynx-Karzinoms vorhersagen?
3. CSC-Marker in HNSCC: Hat die Expression von CSC-Markern in Tumorgewebe Einfluss auf die Prognose von HNSCC-Erkrankungen? Ergeben sich Unterschiede zwischen primär chirurgisch und primär bestrahlten Patientenkollektiven? Gibt es Unterschiede bei der Expression von CSC-Markern in gesunder Schleimhaut beziehungsweise HNSCC-Geweben?
4. Regenerative Medizin bei HNSCC: Bleiben adipogene mesenchymale Stammzellen bei der Lipoaspiration aus Bauchfett erhalten und wie sind diese molekular charakterisiert? Haben adipogene mesenchymale Stammzellen Einfluss auf die Neo-Angiogenese beziehungsweise auf das Wachstum und das Migrationsverhalten von Plattenepithelkarzinom-Zellen?

3 Betrachtung der Teilprojekte

3.1 Arbeiten zur HPV-Diagnostik in Mundhöhle und Rachen

In dem ersten, in *Archives of Gynecology and Obstetrics* veröffentlichten (Eggersmann et al. 2019; (28)) Teil dieses Teilprojektes sollte in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe die Prävalenz einer akuten oder persistierenden oropharyngealen Infektion mit HPV bei Sexualpartnern von Patientinnen mit persistierender HPV-Infektion im Bereich der Cervix uteri bestimmt werde

Es erfolgte bei 144 Patientinnen mit bekannter HPV-Infektion im Bereich der Cervix uteri, 77 Patientinnen ohne cervicale HPV-Infektion sowie insgesamt 157 Sexualpartnern eine HPV-DNA-Diagnostik sowie eine Erhebung anamnestischer Daten mittels Fragebögen.

Bei den Patientinnen mit HPV-Infektion im Bereich der Cervix uteri fand sich in etwa der Hälfte der Fälle und somit am häufigsten der HPV-Subtyp 16. Bei 37,5% der Patientinnen konnte ein HPV-Subtyp nachgewiesen werden, bei 34% der Patientinnen fanden sich zwei HPV-Subtypen beziehungsweise bei 28,4% mehr als zwei HPV-Subtypen. Nur bei einer dieser 144 Frauen fand sich in der oropharyngealen Abstrichdiagnostik der Nachweis von HPV-DNA, die in der Cobas-Testung als Nicht-Subtyp 16/Nicht-Subtyp 18 klassifiziert wurde; die orale Lavage mit physiologischer Kochsalz-Lösung erbrachte bei dieser Patientin keinen HPV-DNA-Nachweis. Diese Patientin hatte anamnestisch orale Sexualpraktiken praktiziert. Bei keiner der cervical-HPV-negativen Patientinnen fand sich oral beziehungsweise oropharyngeal HPV-DNA.

Ebenfalls bei nur einem der 157 Sexualpartner fand sich Nicht-Subtyp 16-/Nicht-Subtyp 18-HPV-DNA in der oralen Lavage, jedoch nicht in der oropharyngealen Abstrichdiagnostik. Bei dessen Partnerin konnte cervical HPV-DNA Subtyp 16 nachgewiesen werden. Dieser Sexualpartner verneinte im Anamnesebogen jedoch orale Sexualpraktiken.

Insgesamt zeigte sich die Prävalenz oraler beziehungsweise oropharyngealer persistierender HPV-Infektionen mit 0,7% in dieser Kohorte als sehr niedrig und bestätigt damit Zahlen der Studien von Kellokoski et al. mit 1,0% beziehungsweise Meyer et al. mit 1,4% (29, 30). Insgesamt scheinen genital-orale/oropharyngeale Transmissionen beziehungsweise zumindest persistierende orale/oropharyngeale HPV-Infektionen seltene Ereignisse darzustellen.

Darüber hinaus variiert diese Prävalenz in verschiedenen Studienkohorten zwischen 0% und 50% in der Literatur sehr stark. Gründe hierfür können die Selektionskriterien der Kohorten,

die sehr variable Größe der Kohorten ($n = 10-309$), aber auch die verschiedenen genutzten Nachweismethoden sein (31-34).

Im Folgeprojektteil, das in *Anticancer Research* publiziert wurde (35), wurde deshalb weiter untersucht, ob sich die zuvor verwendeten Techniken des oropharyngealen Abstrichs und der oralen Lavage mit physiologischer Kochsalz-Lösung eignen, um HPV-DNA als biologischen Marker eines HPV-assoziierten HNSCC nutzen zu können.

Hierfür wurden 20 PatientInnen, bei denen im Rahmen einer Panendoskopie und gegebenenfalls Lymphknotenentnahme in unserer Klinik letztlich ein HPV-assoziiertes oropharyngeales HNSCC nachgewiesen werden konnte, ausgewählt, mittels Fragebögen anamnestiziert und vor dieser chirurgischen Intervention einer nicht-invasiven HPV-Diagnostik mit oropharyngealem Abstrich und oraler Lavage unterzogen.

Bei 15 der PatientInnen fand sich das Karzinom im Bereich der Gaumentonsillen, bei 5 PatientInnen im Bereich des Zungengrundes. Lediglich bei 10 PatientInnen dieses Kollektivs ließ sich nicht-invasiv HPV-DNA nachweisen, mit beiden Techniken gleichermaßen, so dass sich diesbezüglich kein Unterschied zwischen beiden Methoden ausmachen ließ. Es zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Wahrscheinlichkeit eines HPV-Nachweises hinsichtlich der Größe des Tumors und der makroskopischen Sichtbarkeit. Bei kleinen, in der Spiegeluntersuchung nicht makroskopisch sichtbaren Tumoren, die gegebenenfalls hauptsächlich submukös wuchsen, konnte keine HPV-DNA identifiziert werden, bei größeren, oberflächlich wachsenden Tumoren hingegen schon (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Tumorcharakteristik und Ergebnisse der Abstrich- und Mundspüldiagnostik zur HPV-DNA-Diagnostik, modifiziert nach (35)

	Tumor- klassifikation	Tumor- erscheinung	Tumorlokalisation	p16	HPV-Ergebnis		Sichtbar- keit
					Bürste	Spülung	
1	pT1 (17mm)	oberflächl. ulzeriert	Tonsille	+	+	+	+
2	pT1 (18mm)	papillär	Tonsille	+	+	+	+
3	cT2 (38mm)	papillär	Tonsille	+	+	+	+
4	pT2 (28mm)	oberflächl. ulzeriert	Zungengrund	+	+	+	+
5	pT1 (12mm)	oberflächl. ulzeriert	Tonsille	+	+	+	+
6	pT2 (25mm)	oberflächl. ulzeriert	Tonsille	+	+	+	+
7	pT2 (30mm)	oberflächl. ulzeriert	Zungengrund	+	+	+	+
8	pT2 (29mm)	papillär	Tonsille	+	+	+	+

9	pT1 (20mm)	oberflächl. ulzeriert	Tonsille	+	+	+	+
10	pT2 (25mm)	oberflächl. ulzeriert	Tonsille	+	+	+	+
11	pT1 (5mm)	submukös	Zungengrund	+	-	-	-
12	pT1 (12mm)	submukös	Tonsille	+	-	-	-
13	pT1 (10mm)	submukös	Tonsille	+	-	-	-
14	pT1 (5mm)	submukös	Zungengrund	+	-	-	-
15	pT1 (10mm)	nicht sichtbar	Tonsille	+	-	-	-
16	pT1 (9mm)	submukös	Tonsille	+	-	-	-
17	pT1 (15mm)	submukös	Zungengrund	+	-	-	-
18	pT1 (10mm)	nicht sichtbar	Tonsille	+	-	-	-
19	pT2 (24mm)	submukös	Tonsille	+	-	-	-
20	pT1 (8mm)	submukös	Tonsille	+	-	-	-

Ein Grund für dieses Ergebnis könnte sein, dass sich HPV am ehesten an der Basis der tonsillären Krypten beziehungsweise in der Tiefe des Zungengrundes „verstecken“ könnte sowie dort von einem Biofilm geschützt wird und sich somit den beiden Untersuchungstechniken entzieht (12, 36-39). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Nutzung dieser Techniken sowohl für eine Früherkennung von HPV-assoziierten HNSCC als auch als Markerdiagnostik in der Tumornachsorge von HNSCC kritisch zu sehen und eher nicht geeignet wäre, da Tumore beziehungsweise Rezidive möglicherweise übersehen werden könnten.

3.2 Arbeiten aus der Yale-Kooperation mit Radiomics/Machine Learning in HNSCC

Auch medizinische Bildgebung kann zur nicht-invasiven Diagnostik bei HNSCC eingesetzt werden. Modalitäten wie die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT), die Computer-Tomographie (CT), in der Regel nach Applikation von Kontrastmittel oder auch die Fusion von Positronen-Emissions-Tomographie mit CT-Bildern (PET-CT) haben hier großen Stellenwert und jede Modalität hat hinsichtlich der diagnostischen Einordnung bei HNSCC besondere Stärken.

Bei sogenannten „omics“-Analysen ist die definierende Zielsetzung die kollektive und quantitative Charakterisierung umfangreicher biomedizinischer Datensätze, die z.B. alle oder

möglichst viele genetische Eigenschaften (*Genomics*), Proteine (*Proteomics*), Genabschriften (*Transkriptomics*) etc. eines Gewebes oder Organismus abbilden (40-42). Hier werden teils sogar entsprechende Signaturen für Speichel oder Stoffwechsel für das HNSCC postuliert (43, 44). In ähnlicher Weise strebt *Radiomics* an, medizinische Bilddaten möglichst detailliert quantitativ zu charakterisieren. Hierzu werden mittels Computer-Algorithmen zahlreiche (hunderte bis tausende) „Maßzahlen“ berechnet, die verschiedene Qualitäten wie Form, Dichte, Textur etc. eines Bildes oder Bildausschnitts, beispielsweise eines Tumors widerspiegeln. Zur Analyse der hochdimensionalen *Radiomics*-Datensätze kann Künstliche Intelligenz (engl. Artificial Intelligence) in Form von Machine-Learning-Algorithmen zum Einsatz kommen (45, 46).

Bislang werden radiologische Bilddaten nahezu ausschließlich qualitativ-visuell durch RadiologInnen analysiert. Eine umfangreiche quantitative Charakterisierung der Bilder oder darin enthaltener Läsionen hat sich noch nicht etabliert. *Radiomics*-Analysen deuten jedoch auf einen weitaus größeren Informationsgehalt der klinischen Bildgebung hin, als bis dato durch reine „Experteninterpretation“ erfasst wurde (45, 46). Es gilt insbesondere zu berücksichtigen, dass beispielsweise CT-Scans bereits jetzt standardmäßig bei vielen PatientInnen durchgeführt werden. *Radiomics*-Analysen bieten daher Potential zur Erweiterung des Nutzungsspektrums der klinischen Bildgebung um Aspekte der Prognostik, molekularen Charakterisierung und Therapieplanung, ohne zusätzliche Invasivität, Belastungen für die PatientInnen oder maßgeblich höhere Kosten zu verursachen (45).

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (*LMU*) und der Neuroradiology Section des Department of Radiology and Biomedical Imaging (*Yale School of Medicine*) wurden nun mehrere Fragestellungen zur Diagnostik und Prognostik bearbeitet.

Ein erster Projektabschnitt war mit der Detektion des HPV-Status bei oropharyngealen HNSCC befasst. Hierfür standen öffentliche Bilddatensätze von PET-CT-Untersuchungen bei HNSCC aus „The Cancer Imaging Archive (TCIA)“ sowie Datensätze der Yale School of Medicine zur Verfügung. Aus über 400 Patientenfällen wurden eine Trainingskohorte für das Machine Learning der Algorithmen zusammengestellt, deren Modelle dann mit kleineren unabhängigen Kohorten validiert wurden (**Abbildungen 1 und 2**).

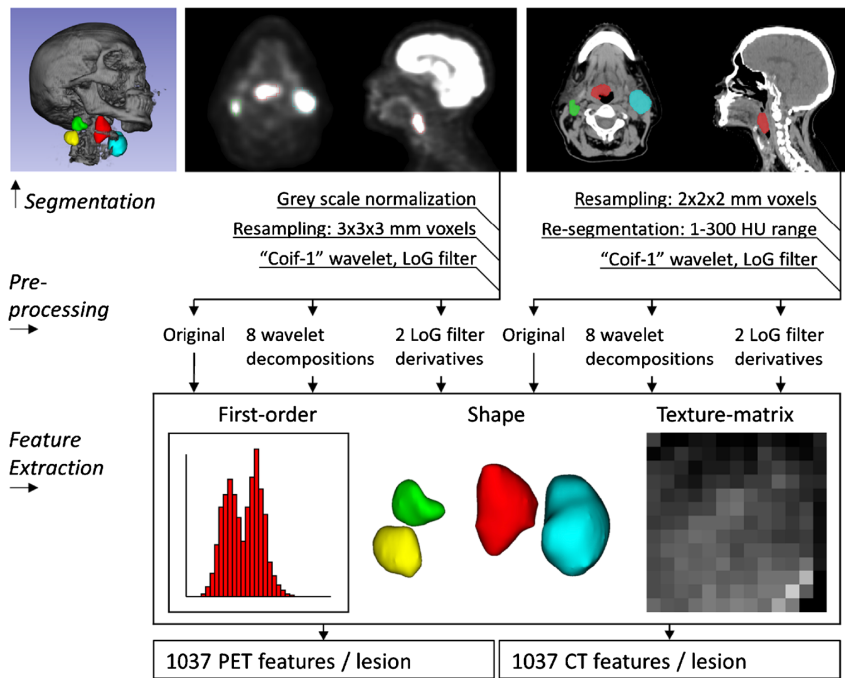


Abbildung 1 Methodisches Vorgehen beim Auslesen der Radiomic Features: Im ersten Schritt erfolgt die segmentweise Analyse der PET- und CT-Bildsätze (beispielsweise aus den axialen Schichten), hieraus ergibt sich durch Zusammensetzen der einzelnen Schichten die Tumore bzw. Lymphknotenmetastasen als drei-dimensionale Zielvolumen, bestehend aus vielen kleinen einzelnen Bildwürfeln („voxel“). Durch verschiedene Filtermechanismen („Pre-processing“) und automatisierte Berechnungen lassen sich nun viele einzelne Features wie die Form („Shape“) oder das Tumolvolumen bestimmen und auslesen. Abbildung entstammt (47).

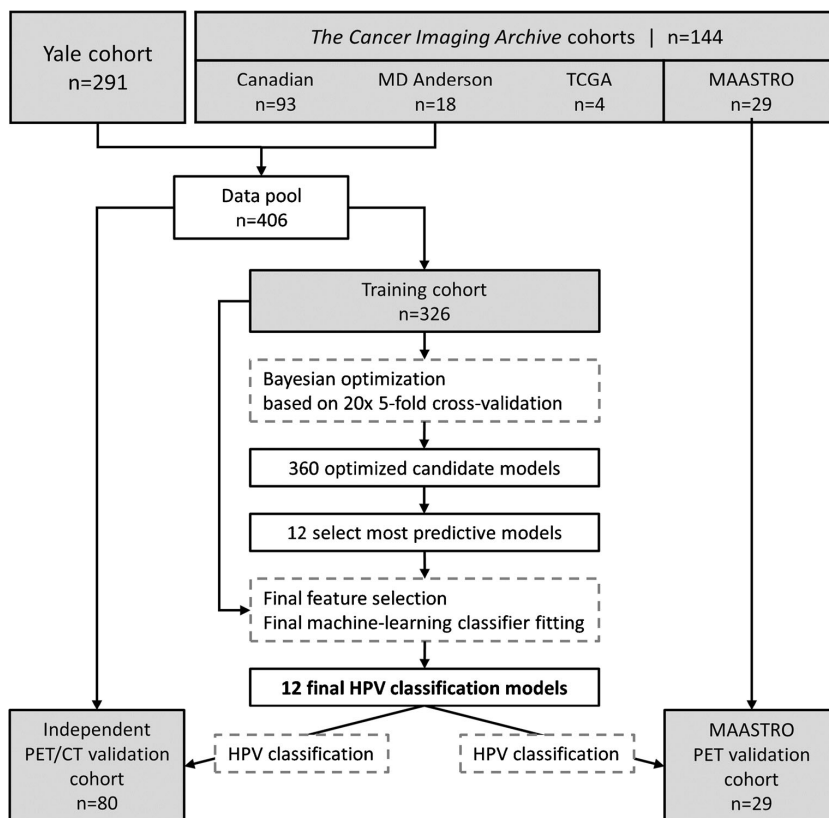


Abbildung 2 Kohortenbildung und Analyseweg des Maschinellen Lernens: Aus den verschiedenen Kohorten wurden eine Trainings- und zwei Validierungskohorten gebildet. Auf Basis der Trainingskohorte erfolgte ein maschinelles Lernen auf Basis der Radiomic Features, auf dessen Basis zwölf Algorithmen-Modelle erstellt wurden. Diese finalen Berechnungsmodelle wurden dann an den Validierungskohorten getestet. Abbildung entstammt (47).

Die Machine-Learning-Modelle konnten zeigen, dass CT- und PET-Radiomics-Daten die HPV-Assoziation der Tumoren vorhersagen können und hierbei Modellen auf Basis der einzelnen Modalitäten PET und CT überlegen sind. Darüber hinaus konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die in PET-Radiomics codierten metabolischen Informationen zur HPV-Status-Detektion geeignet sind. Aufbauend auf diesen Ergebnissen könnten in Zukunft nicht-invasive Radiomics-Biomarker für den HPV-Status die Informationen aus invasiven Probeentnahmen ergänzen oder perspektivisch vielleicht ersetzen. Die Ergebnisse dieser Studie wurden im *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* publiziert (Haider et al. 2020; (47), **Abbildung 3**).

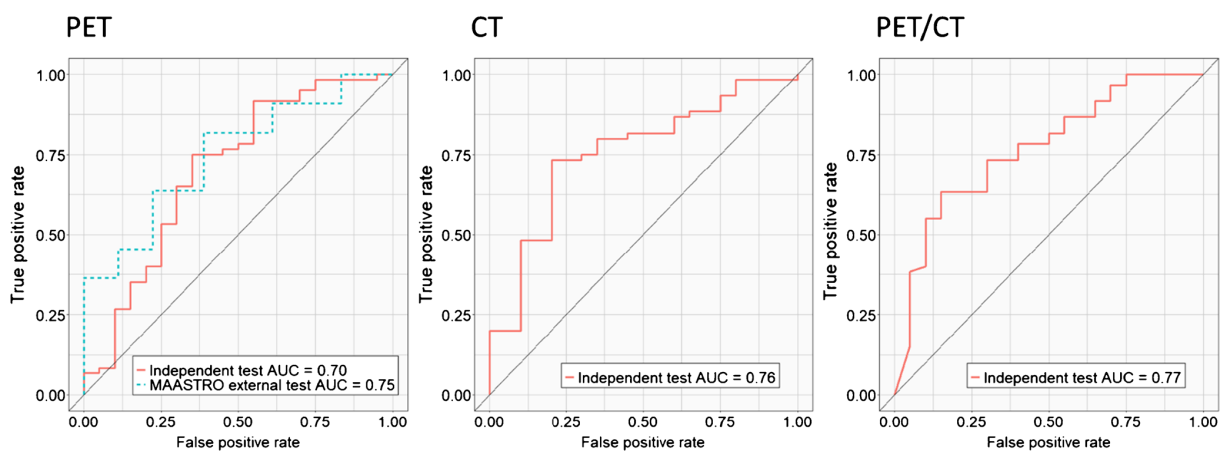
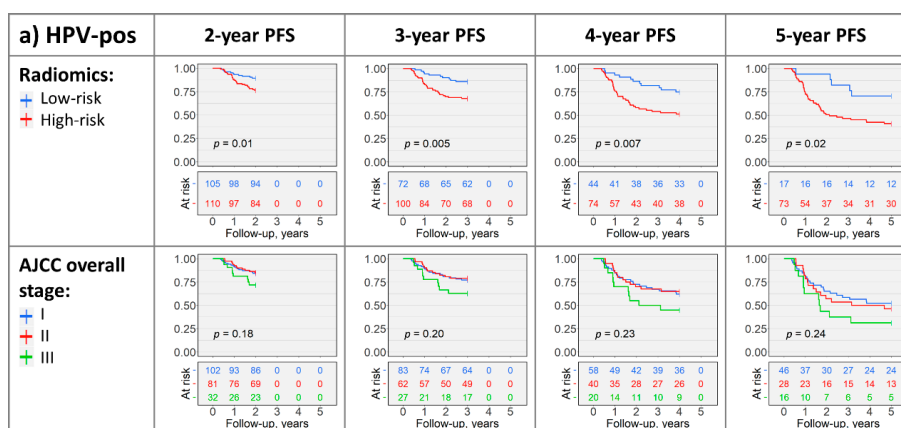


Abbildung 3 „Receiver Operating Characteristic“ (ROC) Kurven der Validierungskohorten: Die Kurven sind jeweils für PET-, CT- beziehungsweise kombinierten PET/CT-Radiomic Features der Primärtumor-Volumina aufgetragen. Die Fläche unterhalb der Kurve (area under the curve, AUC) gibt die Güte der Vorhersage-Modelle an. *Abbildung aus (47).*

In einem weiteren Projektabschnitt konnte ein additiver Nutzen der PET- und CT-Radiomics-Marker in der Tumor-Prognostik aufgezeigt werden. Die Ergebnisse unserer Kooperation deuten darauf hin, dass Radiomics-Analysen bei HPV-positiven Tumoren präzisere Vorhersagen hinsichtlich des Gesamtüberlebens erlauben als das etablierte UICC-Tumor-Staging-System. Diese Daten konnten erfolgreich in *Cancers* publiziert werden (Haider et al 2020; (48); **Abbildung 4**).



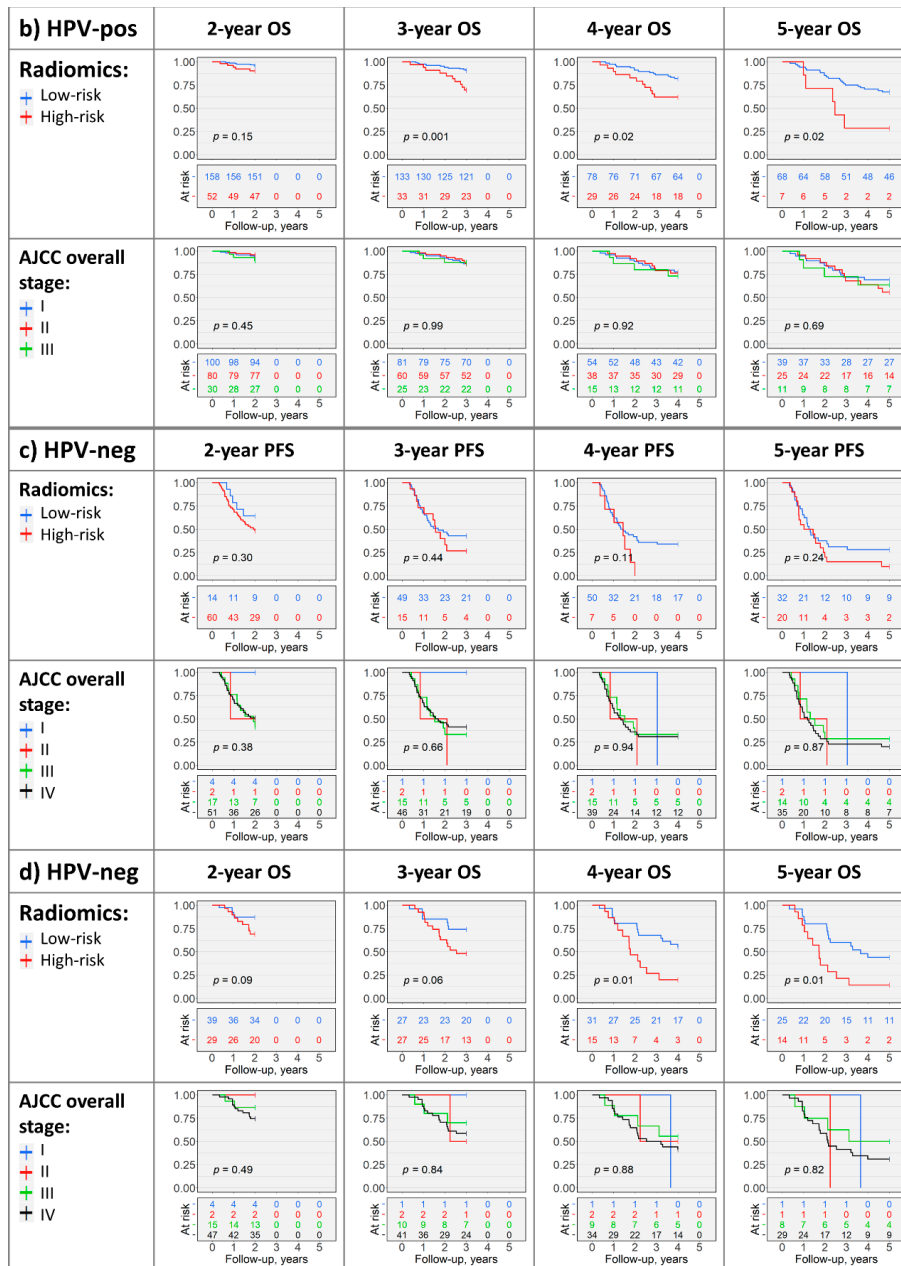


Abbildung 4 Risikostratifikationen zum Überleben in Oropharynxkarzinomen: Kaplan-Meier-Kurven zeigen die Überlebenskurven für HPV-positive (a) und b)) beziehungsweise HPV-negative (c) und d)) Oropharynxkarzinome, gegenübergestellt sind die risikostratifizierten Subkohorten nach dem Radiomics-Modell beziehungsweise dem AJCC-Krankheitsstaging für das progressionsfreie Überleben (a) und c)) und Gesamtüberleben (b) und d)). Abbildung aus (48).

Darüber hinaus konnten wir anhand des Datensatzes zeigen, dass die Machine Learning-Algorithmen Vorteile bei der Vorhersage der lokoregionären Progression als wichtigem Endpunkt für die lokale Tumortherapie haben können. Die korrespondierende Publikation findet sich seit kurzem in *Translational Oncology* (Haider, Sharaf et al. 2021; (49), **Abbildung 5**).

Somit könnten *Radiomics*-Analysen zukünftig Schlüssel zu personalisierter Prognostik und Therapie werden, mit entsprechendem Potential für verbesserte Therapieerfolge bei HNSCC-Erkrankungen (41, 45).

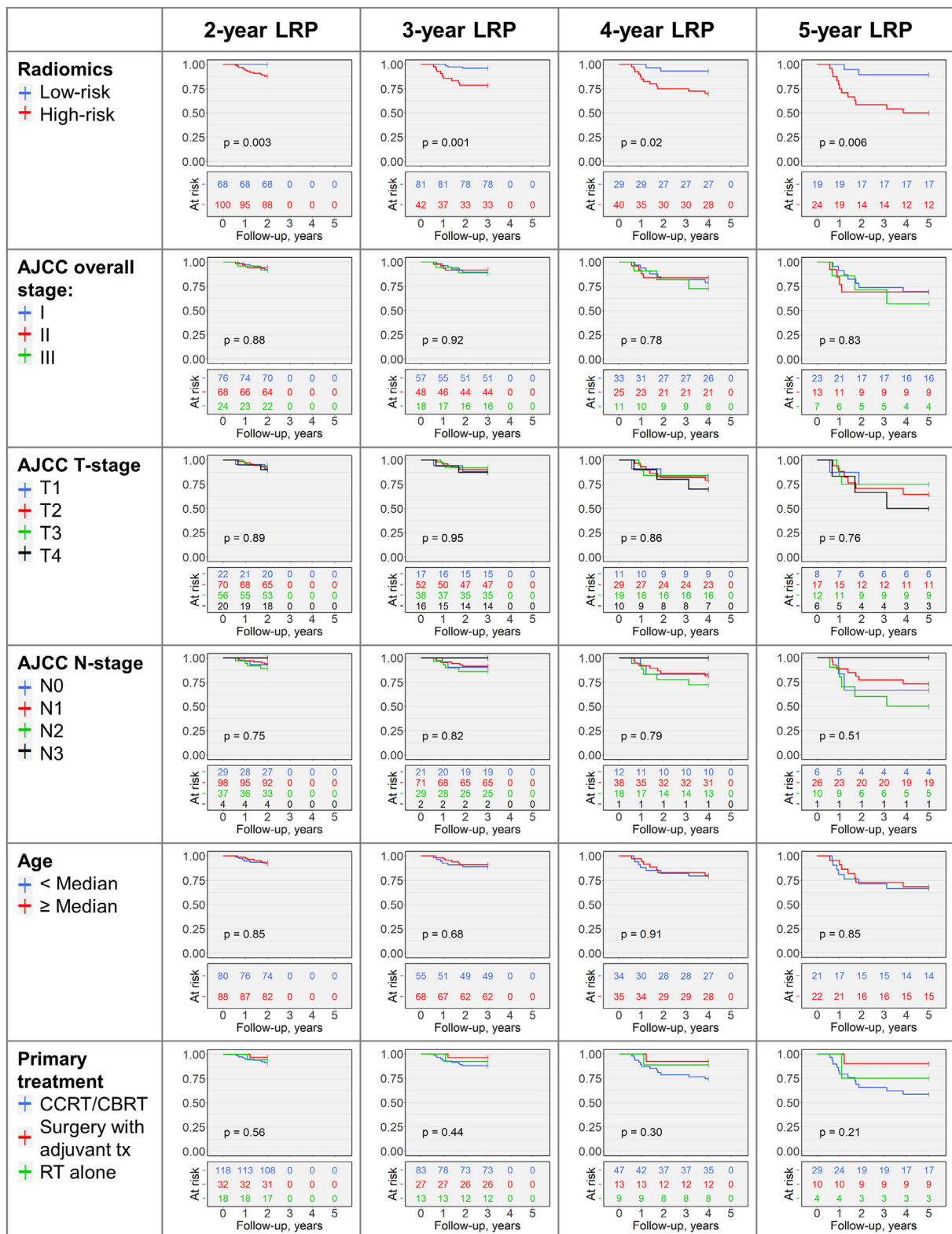


Abbildung 5 Risikostratifikation zum Auftreten eines lokoregionären Progresses (LRP): Die Risikostratifikation erfolgte anhand verschiedener Modelle, jeweils für das Auftreten eines lokoregionären Progresses binnen zwei, drei, vier und fünf Jahren, auf Basis der Radiomic Features, des AJCC-Gesamtstaging, des AJCC-Tumorstaging, des AJCC-Nodalstaging, des Patientenalters und der primären Behandlung. Lediglich das Modell anhand der Radiomic Features zeigte eine statistisch signifikante Risikostratifikation (Log rank Test). Abbildung entstammt (49).

3.3 Arbeiten zu CSC-Markern in HNSCC

Um eine Stagnation bei der Verbesserung der Prognose von Krebserkrankungen zu vermeiden, benötigt es die Identifikation neuer prognostischer Marker sowie molekularer Marker und Mechanismen als Ansatz für zielgerichtete Therapien (22). In diesem Kontext werden beispielsweise Krebs-Stammzellen (CSC) als Ziel angesehen, da sie für den Progress und die Wiederkehr von HNSCC verantwortlich gemacht werden. CSC gelten hierbei als „schlafender“ Subtyp von Krebszellen, denen Stammzelleigenschaften zugeschrieben werden und für die postuliert wird, dass sie resistenter gegen nicht-chirurgische Therapien wie Strahlen- oder Chemotherapie sind (23).

Viele Marker wurden zwischenzeitlich mit CSC in Zusammenhang gebracht oder gelten als CSC-Marker (50, 51). Trotz des großen Interesses an diesen Zellen bleiben der prognostische Wert vieler CSC-Marker kontrovers diskutiert (51) und die eindeutige Identifikation von CSC innerhalb von HNSCC unklar (24). In einer ersten Studie des Teilprojektes wurde der prognostische Wert von CSC-Markern in zwei unabhängigen Patientenkohorten mit fortgeschrittenen HNSCC in einer Kooperation mit der Universitätsmedizin Göttingen evaluiert.

85 PatientInnen mit Nachweis eines HNSCCs, die sich einer primären Radio- oder Radiochemotherapie unterzogen (pRCT-Kohorte), sowie 95 PatientInnen mit HNSCC, die mit einer chirurgischen Therapie und teils mit anschließender adjuvanter Radio- oder Radiochemotherapie behandelt wurden (chirurgische Kohorte), wurden inkludiert. Das Gesamt- (overall survival, OS), das krankheitsfreie (disease free survival, DFS) und das krankheitsspezifische Überleben (disease specific survival, DSS) wurden bestimmt (**Abbildung 6**). In Tumorproben wurde die Expression von CSC-Markern (ALDH1, BCL11B, BMI-1 und CD44) bestimmt.

In der pRCT-Kohorte und den HPV-stratifizierten Subkohorten hatte keiner der klinischen Parameter Einfluss auf das Überleben. Eine hohe Expression von BMI-1 und CD44 war mit einem signifikant schlechteren Überleben assoziiert (BMI-1: OS, DFS; CD44: OS, DFS, DSS). In der chirurgischen Kohorte hatten ein negativer HPV-Status, eine R1-Resektion und ein Lymphknotenbefall in der HPV-negativen Subkohorte eine signifikante Assoziation zu schlechterem Überleben, jedoch keiner der getesteten CSC-Marker.

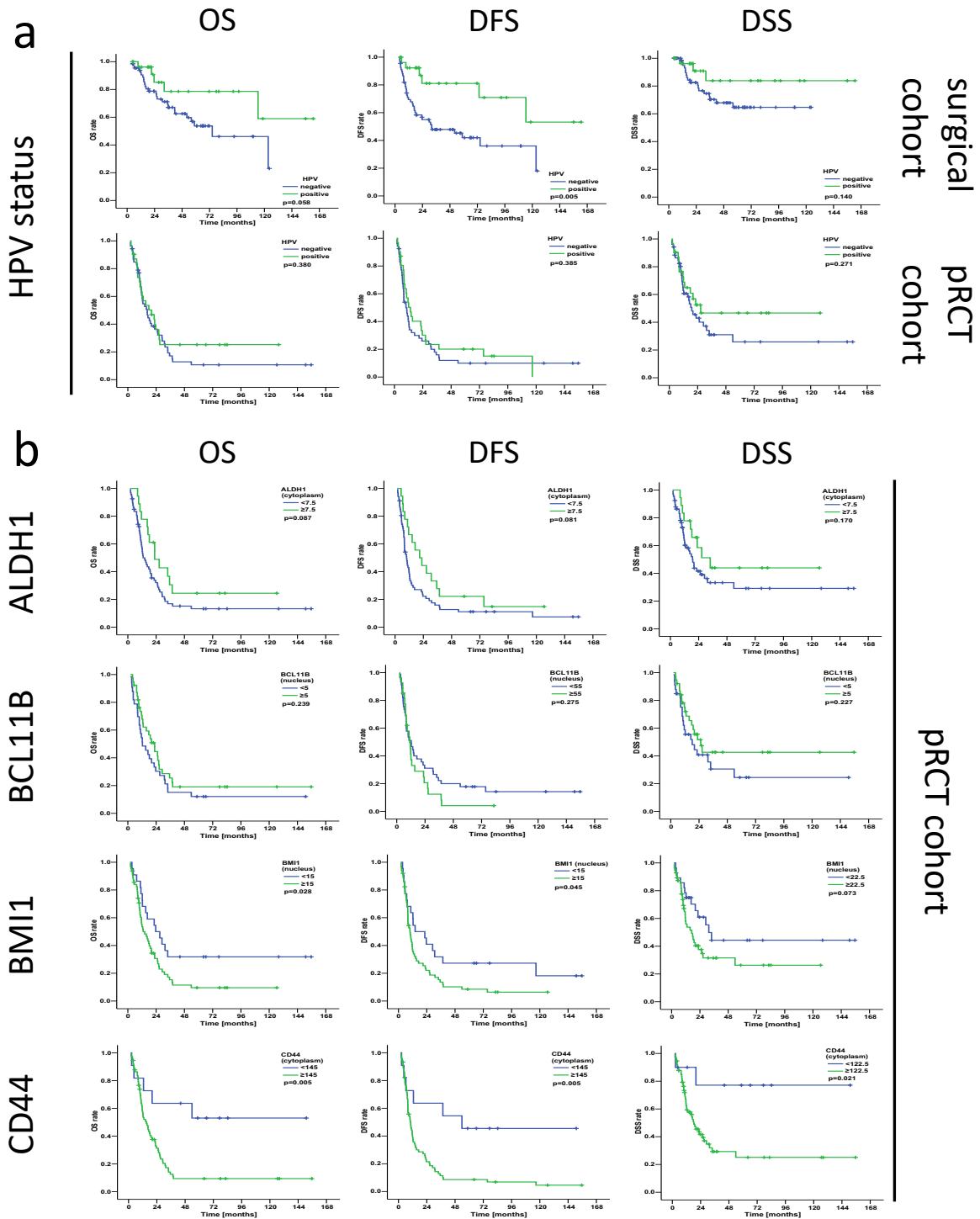


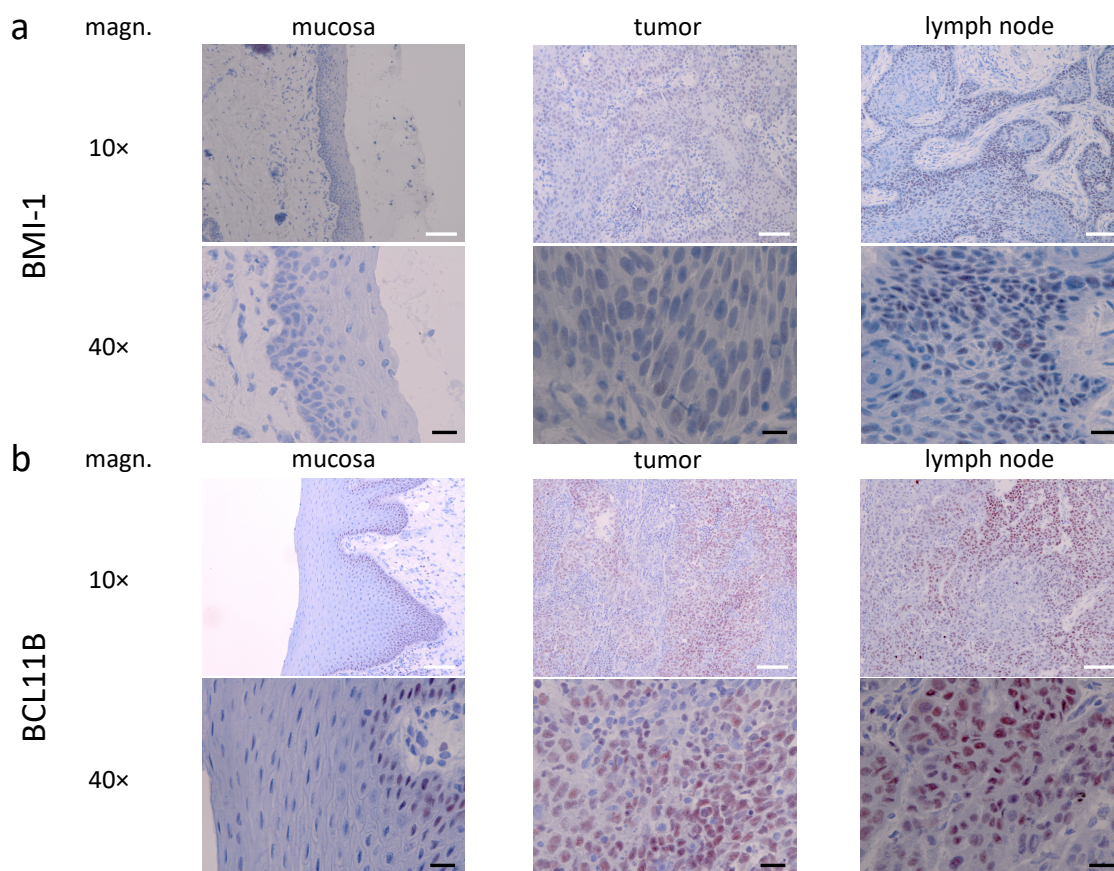
Abbildung 6 Risikostratifizierung anhand des HPV-Status in den Kohorten (a) beziehungsweise anhand der CSC-Marker in der Kohorte mit primär radio(chemo)therapierten PatientInnen (pRCT cohort): In der primär chirurgisch therapierten Kohorte zeigte sich ein signifikant besseres Überleben (OS: Gesamtüberleben, DFS: krankheitsfreies Überleben, DSS: krankheitsspezifisches Überleben), während sich für die pRCT-Kohorte überraschenderweise kein solcher Überlebensvorteil zeigte. In der pRCT-Kohorte zeigten sich jedoch vor allem die CSC-Marker BMI-1 und CD44 zur Risikostratifizierung geeignet. Abbildung entstammt (52).

So ließ sich folgern, dass in der HNSCC-Patientenkohorte mit Therapieentscheidung zur primären Radio(chemo)therapie eine hohe Expression von den CSC-Markern BMI-1 und CD44 mit einer schlechteren Prognose assoziiert war, während sie dies in der chirurgischen

Kohorte nicht ist. Das frühzeitige Testen der molekularen Marker erscheint möglicherweise insbesondere bei inoperablen Fällen sinnvoll. Diese Ergebnisse konnten in *Strahlentherapie und Onkologie* veröffentlicht werden (Jakob, Sharaf et al. 2021; (52)).

Ein weiteres Ziel des Habilitationsprojektes war es nun, die Expression von CSC-Markern in unterschiedlichen Gewebetypen, nämlich makroskopisch gesunder Schleimhaut, Primärtumorgewebe und Lymphknotenmetastasen zu bestimmen, um etwaige Unterschiede der Expression zwischen den Gewebetypen oder den Markern zu identifizieren.

Das Kollektiv bestand aus zwölf konsekutiv operierten Patientinnen und Patienten mit sieben HPV-positiven und fünf HPV-negativen nodal metastasierten HNSCC. Es wurden bei allen Patienten histologische Schnitte dieser drei Gewebetypen aufgearbeitet und die Expression der CSC-Marker ALDH1A1, BCL11B, BMI-1 und CD44 bestimmt (**Abbildung 7**). Hierzu wurden wie in der vorigen Arbeit so genannte „H-Scores“ anhand der Intensität (0 für keine Expression, 1 für eine geringe Expression, 2 für eine starke Expression und 3 für eine sehr starke Expression) und den Anteilen der jeweiligen Intensität in einem Gewebeschnitt in Prozent bestimmt, für die sich entsprechend Werte von 0-300 ergeben konnten.



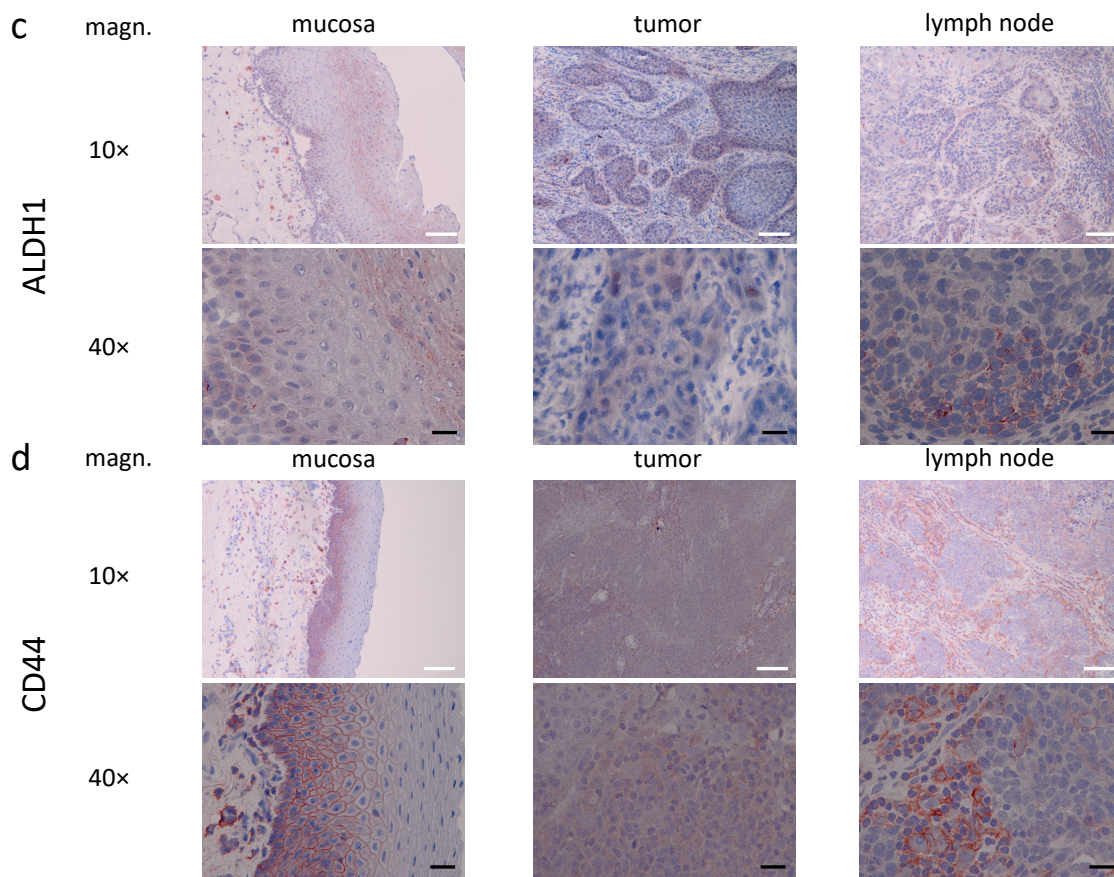


Abbildung 7 Repräsentative Beispiele für immunhistochemische Färbungen der CSC-Marker BMI-1 (a), BCL11B (b), ALDH1 (c) und CD44 (d) in makroskopisch gesunder Schleimhaut (mucosa), Primärtumor (tumor) und Lymphknotenmetastasen (lymph node): Fotografien in 10× und 40× Vergrößerung, in den ausgewählten Schnitten fand sich innerhalb der ausgewerteten Kohorte einer der medianen „H-scores“ für die Expression des jeweiligen CSC-Markers. Abbildung entstammt (53).

Während die Expression von BMI-1 und BCL11B in makroskopisch gesunder Schleimhaut signifikant niedriger als in Tumor- und Lymphknotenmetastasen-Gewebe war, ergaben sich zwischen Tumor- und Lymphknotenmetastasen-Gewebe keine signifikanten Unterschiede (**Abbildung 8**). In der HPV-positiven Subkohorte waren diese Unterschiede für BMI-1 ebenfalls signifikant. Für die anderen beiden CSC-Marker ALDH1A1 und CD44 zeigten sich zwischen den Gewebetypen keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend zeigte sich in dieser in *Current Oncology* veröffentlichten explorativen Studie (Sharaf et al. 2021; (53)), dass die CSC-Marker BMI-1 und BCL11B zwischen gesundem und HNSCC-Gewebe unterscheiden können, während die Expression von ALDH1A1 und CD44 in den Gewebetypen ähnlich war. Somit könnten insbesondere BMI-1 und BCL11B geeignet sein, um CSC in HNSCC-Gewebe besser identifizieren zu können.

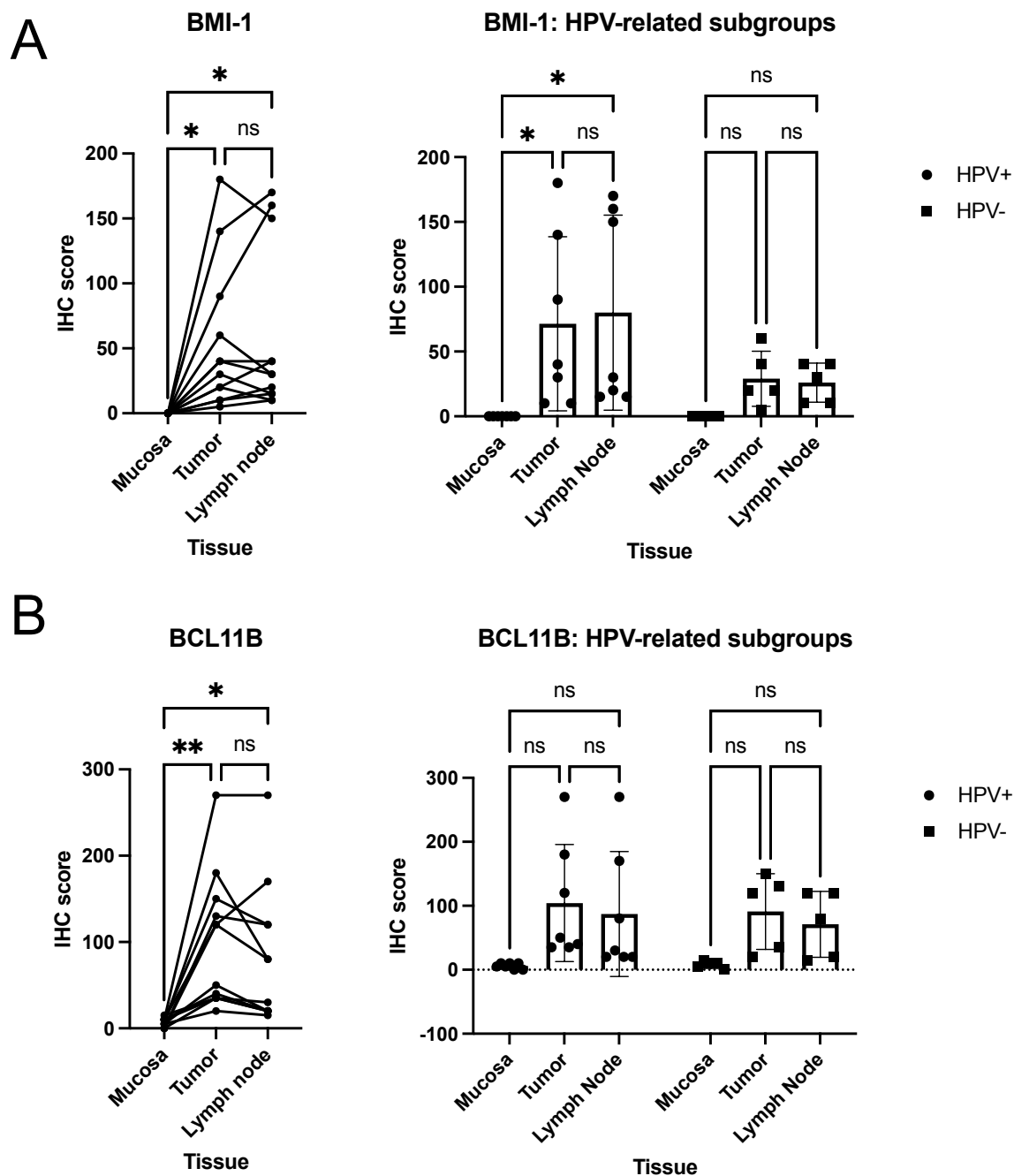


Abbildung 8 Expression der CSC-Marker BMI-1 (A) und BCL11B (B) in makroskopisch gesunder Schleimhaut (Mucosa), Primärtumor (Tumor) und Lymphknotenmetastasen (Lymph Node) in der Kohorte und den HPV-distinkten Subgruppen: Die verbundenen Punkte stellen einen individuellen HNSCC-Patientenfall der explorativen Analyse dar. Gezeigt sind Mittelwerte beziehungsweise Mittelwerte mit Standardabweichung in den Subgruppen. Als statistische Tests dienten in der Gesamtkohorte one way RM ANOVA und in den Subkohorten two-way RM ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. $p > 0.05$). Die Abbildung entstammt (53).

3.4 Arbeiten zur regenerativen Medizin bei HNSCC

Krankheits- und therapiebedingte Gewebeschädigungen können zu erheblichen funktionellen und ästhetischen Einschränkungen bei KrebspatientInnen führen. Insbesondere die beim HNSCC häufigen Kombinationstherapien aus Chirurgie und Strahlentherapie können so zu schwierig zu behandelnden Folgeerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich wie etwa Substanzdefekten im Bereich der Stimmlippen mit Heiserkeit sowie kosmetisch störende Halsnarben führen (54). Als eine Möglichkeit der Behandlung dieser Folgeerkrankungen werden Augmentationen mit Eigenfett angewendet, erstmalig bereits 1893 durch den deutschen Chirurgen Neuber (25) und sehr häufig auch im gynäkologischen Bereich (55).

Als besonders wirksam gilt bei Augmentationen mit Eigenfett deren Gehalt an mesenchymalen Stammzellen, die maßgeblich zur Wundheilung und Geweberegeneration beitragen sollen. Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (ASC) werden seit mehreren Jahren erfolgreich in der regenerativen Medizin und zunehmend auch im Kopf-Hals-Bereich eingesetzt (54, 56, 57). Die Lipoaspiration mit anschließender Zentrifugation soll eine schonende Methode zur Gewinnung von ASC zur autologen Transplantation darstellen (26). Der Nachweis von ASC, ihrer Differenzierbarkeit und deren molekulares Potential zur Wundheilung waren bislang für diese Methode nicht erbracht.

Deshalb wurde Restmaterial von solchen Lipoaspiraten aus dem Bauchfett von PatientInnen verwendet, welche eine Entnahme im Rahmen einer Stimmlippenaugmentation oder Halsnarbenkorrektur erhielten. Dann wurden Zellen aus Explantkulturen kultiviert und immunhistochemisch und durchflusszytometrisch auf Stammzell-Marker analysiert. Die kultivierten Zellen wiesen unter anderem eine hohe Expression für CD105, CD73 sowie CD90 und eine fehlende Expression für CD45, CD14 sowie HLA-DR auf (**Abbildung 9**).

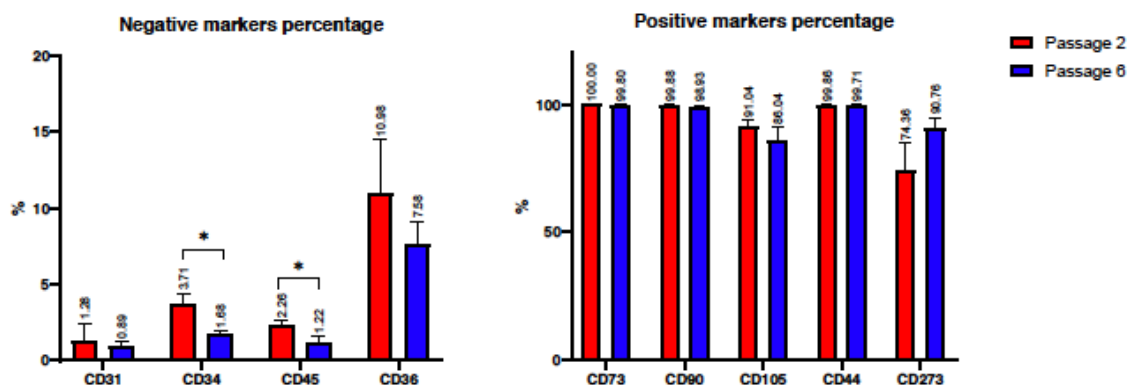


Abbildung 9 Marker-Expression der isolierten und weiter kultivierten Zellen: Es zeigt sich ein für mesenchymale Stammzellen typisches Expressionsmuster, insbesondere in der späteren Passage 6 geht der Anteil der Zellen mit Expression der Negativmarker (links) zurück. Die Abbildung ist modifiziert nach (58).

Die kultivierten Zellen wurden zudem mit definierten Medien einer chondrogenen, osteogenen und adipogenen Differenzierung unterzogen. So ließen sich die Zelllinien aller PatientInnen zudem chondrogen, osteogen und adipogen differenzieren (**Abbildung 10**). Die Zellen erfüllen damit die ISCT-Kriterien für Stammzellen. Die Überstände der Explantkulturen wurden außerdem mittels ELISA auf TNF, VEGF, SDF-1alpha und TGF-beta3 getestet, wobei in den Überständen VEGF und TGF-beta3 nachweisbar waren, TNF und SDF-1alpha jedoch nicht.

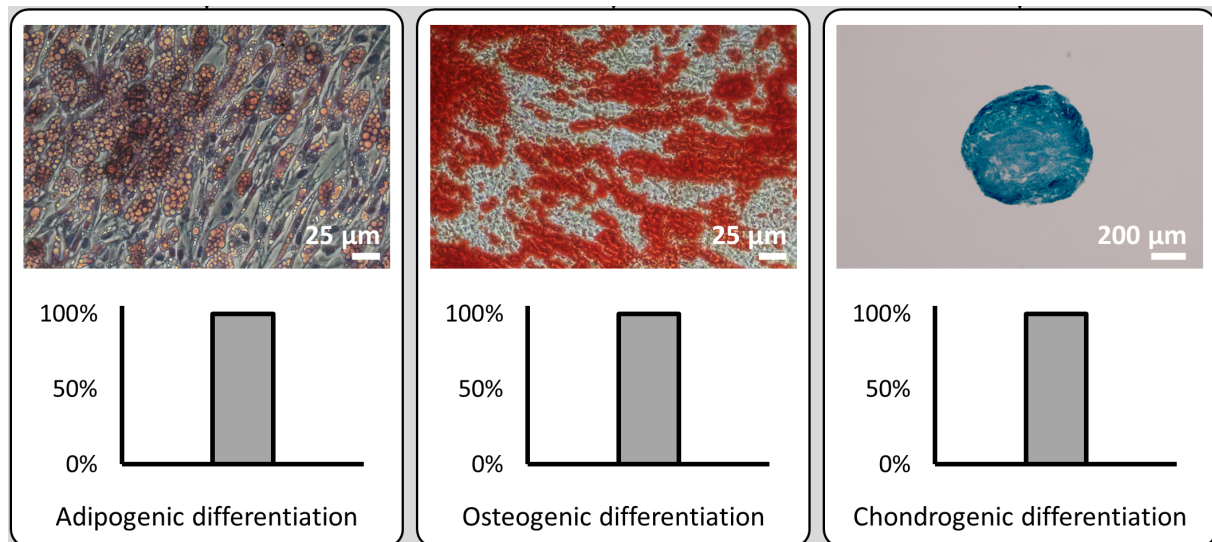


Abbildung 10 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung der ASC: Repräsentative Fotografien der zu Fettzellen (links, Oil Red O Färbung), Knochenzellen (mittig, Alizarin S Färbung) und Knorpelzellen (rechts, Alcian Blau Färbung) differenzierten ASC. Alle ASC-Kulturen konnten in die oben gezeigten mesenchymalen Zelltypen differenziert werden. Abbildung stammt aus (59).

So ließ sich in der in *JAMA Facial Plastic Surgery* publizierte Arbeit (Sharaf et al 2019; (58)) folgern, dass die Lipoaspirate adipogene Stammzellen enthalten, die sich multi-differenzieren können. Das Zytokin-Profil der Lipoaspirate erscheint nicht pro-inflammatorisch, neo-angiogenetisch und wundheilungsfördernd. Hierdurch lässt sich das große Potential der Lipoaspirate für die regenerative Kopf-Hals-Chirurgie molekular erklären.

Ungeklärt bleibt die Frage, wie sich die ASC auf mögliche residuelle HNSCC-Tumorzellen auswirken könnten. Bisher zeigen die wenigen publizierte Studien zu diesem Thema kein eindeutiges Bild hinsichtlich der onkologischen Sicherheit der Stammzell-basierten Therapie im Kopf-Hals-Bereich. Deshalb sollte zusätzlich die Frage bearbeitet werden, welchen Einfluss ASC von PatientInnen auf etablierte Plattenepithelkarzinom-Zelllinien des Kopf-Hals-Bereichs haben.

Hierzu inkubierten wir FaDu-Zellen, einer Hypopharynx-Karzinom-Zelllinie (60), sowie Kyse30-Zellen, einer Ösophagus-Karzinom-Zelllinie (61), mit Überständen von ASC-

Kulturen von fünf PatientInnen, die in einer Lipoaspiration zum Zweck einer autologen Injektion im Kopf-Hals-Bereich gewonnen worden waren.

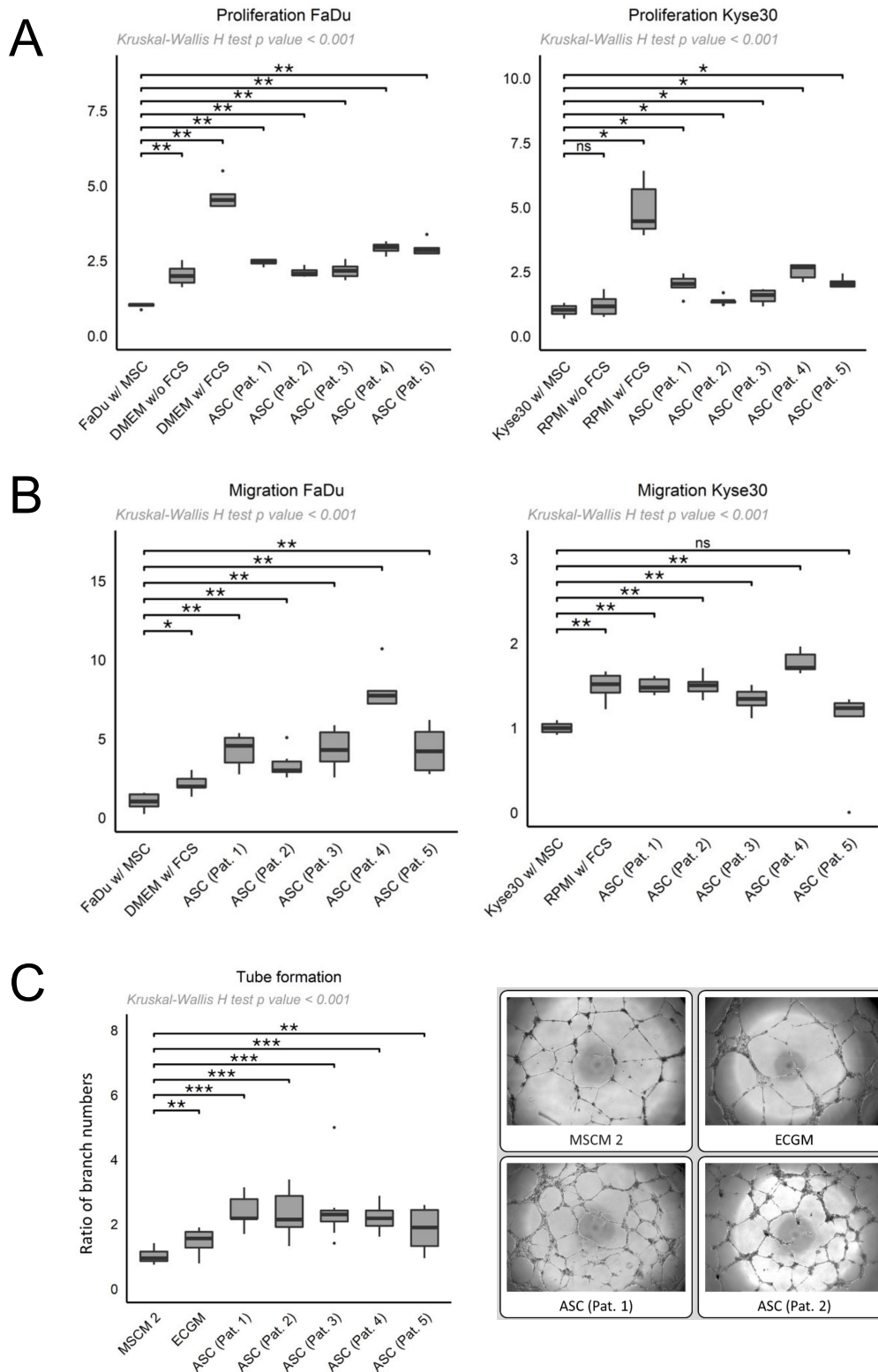


Abbildung 11 Box-whisker Plots zeigen die Proliferation und Migration von FaDu- und Kyse30-Zellen (A und B) sowie die Entstehung endothelialer Tubes der HUVEC (C mit exemplarischen Foto-Beispielen der endothelialen Tubes), die mit ASC-Überständen von fünf Patienten (“ASC (Pat. 1–5)”) beziehungsweise Überständen von FaDu/Kyse30

mit MSC-Medium 2 ("FaDu w/ MSC", "Kyse30 w/ MSC"), den Überständen der jeweiligen Standardmedien DMEM oder RPMI ohne FCS ("DMEM w/o FCS", "RPMI w/o FCS") beziehungsweise mit FCS ("DMEM w/ FCS", "RPMI w/ FCS"), mit MSC-Medium 2 ("MSCM 2") oder Endothelzellmedium ("ECGM") als Kontrollen behandelt wurden (Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten; Gruppen normalisiert zu "FaDu w/ MSC", "Kyse30 w/ MSC" und "MSCM 2"). Statistik: Kruskal–Wallis H Test, p-Werte * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, ns: nicht signifikant. Die Abbildungen entstammen (59).

Im Vergleich zu den Kontrollmedien auf Basis von Standard-Zellkulturmedien zeigen die in *Cancers* veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe (Sharaf et al. 2021; (59)), dass die ASC aller Patientenproben über einen parakrinen Wirkmechanismus das Wachstum und die Migration von FaDu-Zellen steigern und die Neo-Angiogenese von humanen Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVECs) fördern können. Vier von fünf der ASC-Überstände steigerten ebenfalls das Wachstum und die Migration von Kyse30-Zellen.

Die in vitro Versuche zeigen eindeutig tumor-förderliche Effekte von ASC bei Karzinom-Zelllinien des oberen Aerodigestivtrakts. Auch wenn klinische Studien notwendig sind, um die onkologische Sicherheit von ASC-Injektionen im Kopf-Hals-Bereich zu bewerten, liefern die Ergebnisse deutliche Hinweise, dass eine komplette Tumorentfernung soweit klinisch möglich sichergestellt sein sollte, bevor ASC für regenerative Ansätze der Kopf-Hals-Chirurgie genutzt werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend hatte das Habilitationsprojekt das Ziel, Ansätze aufzuzeigen, die Diagnostik und Prognostik von Erkrankungen mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich unter Einsatz verschiedener methodischer Ansätze zu verbessern. Die Identifizierung geeigneter diagnostischer Verfahren mittels molekularer Testung oder computergestützter Bildanalyse und maschinellem Lernen könnten sich langfristig neue Perspektiven für eine verbesserte Diagnostik, sicherere und effizientere personalisierte Therapien bei Erkrankungen mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich eröffnen.

Während die Diagnostik von HPV-DNA aus Mundspülungen beziehungsweise oropharyngealen Bürstenabstrichen zur onkologischen Diagnostik, beispielsweise in der Tumornachsorge, nicht geeignet erscheint, sind der Einsatz von Machine Learning auf Basis von Radiomics ebenso wie die Nutzung von CSC-Markern in der Histopathologie vielversprechende Ansätze in der HNSCC-Diagnostik.

Beide Verfahren könnten potenziell helfen, hinsichtlich der Prognostik bessere individuelle Vorhersagen zu treffen sowie perspektivisch zu individuelleren Therapieentscheidungen zu führen und somit das Konzept der personalisierten Medizin fördern. Gerade auch CSC-Marker könnten interessante molekulare Strukturen für zielgerichtete Therapien darstellen, sodass weitere Anstrengungen zur Forschung im Bereich molekularer Marker sinnvoll erscheinen.

Die Charakterisierung von Fettstammzellen aus Lipoaspiraten trägt dazu bei, die klinisch erprobte Wirkung dieser regenerativen Therapie besser zu verstehen. *In vitro* zeigten sich zudem potenzielle Risiken einer solchen Therapie im onkologischen Kontext, sodass eine komplette Tumorentfernung soweit klinisch möglich sichergestellt sein sollte, bevor Fettstammzellen in ein ehemaliges Tumorgebiet im Kopf-Hals-Bereich eingebracht werden. Zu dieser Fragestellung sind noch weitere klinische Studien nötig.

5 Literaturverzeichnis

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(1):7-33.
2. Spitz MR. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Seminars in oncology*. 1994;21(3):281-8.
3. Reuschenbach M, Tinhofer I, Wittekindt C, Wagner S, Klussmann JP. A systematic review of the HPV-attributable fraction of oropharyngeal squamous cell carcinomas in Germany. *Cancer medicine*. 2019.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021.
5. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(29):3235-42.
6. Gillison ML, Restighini C. Anticipation of the Impact of Human Papillomavirus on Clinical Decision Making for the Head and Neck Cancer Patient. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2015;29(6):1045-60.
7. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(1):24-35.
8. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(1):9-22.
9. Keck MK, Zuo Z, Khattry A, Stricker TP, Brown CD, Imanguli M, et al. Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(4):870-81.
10. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*. 1999;189(1):12-9.
11. Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Viscidi R, Garrett ES, et al. Oral Human Papillomavirus Infection in Adults Is Associated with Sexual Behavior and HIV Serostatus. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(4):686-98.
12. Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, Tong Z-y, Xiao W, Kahle L, et al. Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010. *Jama*. 2012;307(7):693-703.
13. Jensen JS, Christensen JT, Hakansson K, Zamani M, Vogelius IR, Lofgren J, et al. High nodal FDG uptake increases risk of distant metastasis in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2020;47(5):1039-45.
14. Leijenaar RTH, Nalbantov G, Carvalho S, van Elmpt WJC, Troost EGC, Boellaard R, et al. The effect of SUV discretization in quantitative FDG-PET Radiomics: the need for standardized methodology in tumor texture analysis. *Scientific reports*. 2015;5(1):11075.
15. Bogowicz M, Riesterer O, Ikenberg K, Stieb S, Moch H, Studer G, et al. Computed Tomography Radiomics Predicts HPV Status and Local Tumor Control After Definitive Radiochemotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2017;99(4):921-8.
16. Gillies RJ, Kinahan PE, Hricak H. Radiomics: Images Are More than Pictures, They Are Data. *Radiology*. 2016;278(2):563-77.
17. Lu C-F, Hsu F-T, Hsieh KL-C, Kao Y-CJ, Cheng S-J, Hsu JB-K, et al. Machine Learning–Based Radiomics for Molecular Subtyping of Gliomas. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(18):4429.

-
18. Langendijk JA, Psyrri A. The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. *Annals of Oncology*. 2010;21(10):1931-4.
 19. Ragin CCR, Taioli E, Weissfeld JL, White JS, Rossie KM, Modugno F, et al. 11q13 amplification status and human papillomavirus in relation to p16 expression defines two distinct etiologies of head and neck tumours. *British journal of cancer*. 2006;95:1432.
 20. Hess J. Predictive Factors for Outcome and Quality of Life in HPV-Positive and HPV-Negative HNSCC. Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer. 2017;206:233-42.
 21. O'Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, et al. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *The lancet oncology*. 2016;17(4):440-51.
 22. Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *The New England journal of medicine*. 2015;372(9):793-5.
 23. Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral oncology*. 2012;48(1):1-9.
 24. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science (New York, NY)*. 2009;324(5935):1670-3.
 25. Neuber GA. Fett transplantation. *Verl Dtsch Ges Chir*. 1893;22:66.
 26. Haubner F, Lorenz A, Kummer P, Alvarez JCP. [A new atraumatic device for liposuction and injection represents a technical advance for primary fat injection after corpectomy]. *Laryngo- rhino- otologie*. 2018;97(3):163-5.
 27. Fishman JM, Long J, Gugatschka M, De Coppi P, Hirano S, Hertegard S, et al. Stem cell approaches for vocal fold regeneration. *The Laryngoscope*. 2016;126(8):1865-70.
 28. Eggersmann TK, Sharaf K, Baumeister P, Thaler C, Dannecker CJ, Jeschke U, et al. Prevalence of oral HPV infection in cervical HPV positive women and their sexual partners. *Arch Gynecol Obstet*. 2019;299(6):1659-65.
 29. Kellokoski JK, Syrjänen SM, Chang F, Yliskoski M, Syrjänen KJ. Southern blot hybridization and PCR in detection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 1992;21(10):459-64.
 30. Meyer MF, Huebbers CU, Siefer OG, Vent J, Engbert I, Eslick GD, et al. Prevalence and risk factors for oral human papillomavirus infection in 129 women screened for cervical HPV infection. *Oral oncology*. 2014;50(1):27-31.
 31. Badaracco G, Venuti A, Di Lonardo A, Scambia G, Mozzetti S, Benedetti Panici P, et al. Concurrent HPV infection in oral and genital mucosa. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 1998;27(3):130-4.
 32. Castro TP, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72(2):272-82.
 33. Uken RB, Brummer O, von Schubert-Bayer C, Brodegger T, Teudt IU. Oral HPV prevalence in women positive for cervical HPV infection and their sexual partners: a German screening study. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2016;273(7):1933-42.
 34. Woelber L, Breuer J, Meyer T, Vettorazzi E, Prieske K, Bohlmann I, et al. Oral Human Papillomavirus in Women With High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Low Genit Tract Dis*. 2017;21(3):177-83.
-

-
35. Eggersmann TK, Baumeister P, Kumbrink J, Mayr D, Schmoeckel E, Thaler CJ, et al. Oropharyngeal HPV Detection Techniques in HPV-associated Head and Neck Cancer Patients. *Anticancer research*. 2020;40(4):2117-23.
 36. Combes JD, Dalstein V, Gheit T, Clifford GM, Tommasino M, Clavel C, et al. Prevalence of human papillomavirus in tonsil brushings and gargles in cancer-free patients: The SPLIT study. *Oral oncology*. 2017;66:52-7.
 37. Franceschi S, Combes JD, Dalstein V, Caudroy S, Clifford G, Gheit T, et al. Deep brush-based cytology in tonsils resected for benign diseases. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015;137(12):2994-9.
 38. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*. 2006;31(4):259-66.
 39. Rieth KKS, Gill SR, Lott-Limbach AA, Merkley MA, Botero N, Allen PD, et al. Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus in Tonsil Tissue in Healthy Adults and Colocalization in Biofilm of Tonsillar Crypts. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;144(3):231-7.
 40. Chakraborty S, Hosen MI, Ahmed M, Shekhar HU. Onco-Multi-OMICS Approach: A New Frontier in Cancer Research. *BioMed research international*. 2018;2018:9836256.
 41. Sepiashvili L, Bruce JP, Huang SH, O'Sullivan B, Liu FF, Kislinger T. Novel insights into head and neck cancer using next-generation "omic" technologies. *Cancer Res*. 2015;75(3):480-6.
 42. Serafini MS, Lopez-Perez L, Fico G, Licitra L, De Cecco L, Resteghini C. Transcriptomics and Epigenomics in head and neck cancer: available repositories and molecular signatures. *Cancers Head Neck*. 2020;5:2.
 43. Aro K, Kaczor-Urbanowicz K, Carreras-Presas CM. Salivaomics in oral cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019;27(2):91-7.
 44. Shin JM, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Metabolomics of Head and Neck Cancer: A Mini-Review. *Front Physiol*. 2016;7:526.
 45. Giraud P, Giraud P, Gasnier A, El Ayachy R, Kreps S, Foy JP, et al. Radiomics and Machine Learning for Radiotherapy in Head and Neck Cancers. *Frontiers in oncology*. 2019;9:174.
 46. Wei L, Osman S, Hatt M, El Naqa I. Machine learning for radiomics-based multimodality and multiparametric modeling. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2019;63(4):323-38.
 47. Haider SP, Mahajan A, Zeevi T, Baumeister P, Reichel C, Sharaf K, et al. PET/CT radiomics signature of human papilloma virus association in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2020;47(13):2978-91.
 48. Haider SP, Zeevi T, Baumeister P, Reichel C, Sharaf K, Forghani R, et al. Potential Added Value of PET/CT Radiomics for Survival Prognostication beyond AJCC 8th Edition Staging in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*. 2020;12(7).
 49. Haider SP, Sharaf K, Zeevi T, Baumeister P, Reichel C, Forghani R, et al. Prediction of post-radiotherapy locoregional progression in HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma using machine-learning analysis of baseline PET/CT radiomics. *Transl Oncol*. 2021;14(1):100906.
 50. Major AG, Pitty LP, Farah CS. Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Stem cells international*. 2013;2013:319489.
 51. Curtarelli RB, Goncalves JM, Dos Santos LGP, Savi MG, Nor JE, Mezzomo LAM, et al. Expression of Cancer Stem Cell Biomarkers in Human Head and Neck Carcinomas: a Systematic Review. *Stem cell reviews*. 2018.
 52. Jakob M, Sharaf K, Schirmer M, Leu M, Küffer S, Bertlich M, et al. Role of cancer stem cell markers ALDH1, BCL11B, BMI-1, and CD44 in the prognosis of advanced HNSCC. *Strahlenther Onkol*. 2021;197(3):231-45.
-

-
53. Sharaf K, Lechner A, Haider SP, Wiebringhaus R, Walz C, Kranz G, et al. Discrimination of Cancer Stem Cell Markers ALDH1A1, BCL11B, BMI-1, and CD44 in Different Tissues of HNSCC Patients. *Curr Oncol*. 2021;28(4):2763-74.
 54. Krastev TK, Beugels J, Hommes J, Piatkowski A, Mathijssen I, van der Hulst R. Efficacy and Safety of Autologous Fat Transfer in Facial Reconstructive Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA facial plastic surgery*. 2018;20(5):351-60.
 55. Delay E, Savu T, Atanasiu M. [Lipomodelling in breast reconstruction]. *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 2018;63(5-6):505-15.
 56. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2020;16(1):3-32.
 57. Rajabzadeh N, Fathi E, Farahzadi R. Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Investig*. 2019;6:19.
 58. Sharaf K, Kleinsasser A, Schwenk-Zieger S, Gires O, Schinke H, Kohlbauer V, et al. Molecular Characterization of Lipoaspirates Used in Regenerative Head and Neck Surgery. *JAMA facial plastic surgery*. 2019;21(6):526-34.
 59. Sharaf K, Eggersmann TK, Haider SP, Schwenk-Zieger S, Zhou J, Gires O, et al. Human Adipose-Derived Stem/Stromal Cells Promote Proliferation and Migration in Head and Neck Cancer Cells. *Cancers*. 2021;13(11):2751.
 60. Rangan SR. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 1972;29(1):117-21.
 61. Shimada Y, Imamura M, Wagata T, Yamaguchi N, Tobe T. Characterization of 21 newly established esophageal cancer cell lines. *Cancer*. 1992;69(2):277-84.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

6.1 Abbildungen

Abbildung 1 Methodisches Vorgehen beim Auslesen der Radiomic Features. Abbildung entstammt (47).....	8
Abbildung 2 Kohortenbildung und Analyseweg des Maschinellen Lernens. Abbildung entstammt (47).....	8
Abbildung 3 „Receiver Operating Characteristic“ (ROC) Kurven der Validierungskohorten. Abbildung aus (47).....	9
Abbildung 4 Risikostratifikationen zum Überleben in Oropharynxkarzinomen. Abbildung aus (48).	10
Abbildung 5 Risikostratifikation zum Auftreten eines lokoregionären Progresses (LRP). Abbildung entstammt (49).....	11
Abbildung 6 Risikostratifikation anhand des HPV-Status in den Kohorten (a) beziehungsweise anhand der CSC-Marker in der Kohorte mit primär radio(chemo)therapierten PatientInnen (pRCT cohort). Abbildung entstammt (52).	13
Abbildung 7 Repräsentative Beispiele für immunhistochemische Färbungen der CSC-Marker BMI-1 (a), BCL11B (b), ALDH1 (c) und CD44 (d) in makroskopisch gesunder Schleimhaut (mucosa), Primärtumor (tumor) und Lymphknotenmetastasen (lymph node). Abbildung entstammt (53).....	15
Abbildung 8 Expression der CSC-Marker BMI-1 (A) und BCL11B (B) in makroskopisch gesunder Schleimhaut (Mucosa), Primärtumor (Tumor) und Lymphknotenmetastasen (Lymph Node) in der Kohorte und den HPV-distinkten Subgruppen. Die Abbildung entstammt (53).16	
Abbildung 9 Marker-Expression der isolierten und weiter kultivierten Zellen. Die Abbildung ist modifiziert nach (58).	17
Abbildung 10 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung der ASC. Abbildung stammt aus (59).	18
Abbildung 11 Box-whisker Plots zeigen die Proliferation und Migration von FaDu- und Kyse30-Zellen (A und B) sowie die Entstehung endothelialer Tubes der HUVEC (C mit	

exemplarischen Foto-Beispielen der endothelialen Tubes). Die Abbildungen entstammen (59).
..... 19

6.2 Bildrechte

Ich möchte den Inhabern der Bildrechte danken, dass ich die in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen mit ausdrücklicher beziehungsweise konkludenter Zustimmung für die kumulative Habilitationsschrift verwenden darf.

Abbildungen 1, 2, 3:

Die Abbildungen 1-3 entstammen dem Journal *European Journal of Nuclear Medicine* des Herausgebers Springer Nature. Unter der Rightslink-CCC-Lizenznummer 5231430432375 erfolgte die freundliche Erlaubnis zur Nutzung der Abbildungen für einen nicht-kommerziellen Zweck. Die Quelle und Modifikationen wurden kenntlich gemacht. Zusätzlich wurde das Einverständnis der korrespondierenden Autoren eingeholt.

Abbildungen 4, 7, 8, 10, 11:

Die Abbildungen 4, 7, 8, 10 und 11 entstammen aus den genannten Originalartikeln in den Journalen *Cancers* beziehungsweise *Current Oncology* des mdpi-Verlages. Das Copyright unterliegt einer Creative Commons Lizenz (CC BY 4.0; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Alle Quellen und Modifikationen wurden kenntlich gemacht. Zusätzlich wurde das Einverständnis der korrespondierenden Autoren eingeholt.

Abbildung 5:

Die Abbildung 5 stammt aus dem Journal *Translational Oncology* der Elsevier GmbH. Das Copyright unterliegt einer Creative Commons Lizenz (CC BY 4.0; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Die Quelle und Modifikationen wurden kenntlich gemacht. Zusätzlich wurde das Einverständnis der korrespondierenden Autoren eingeholt.

Abbildung 6:

Die Abbildung 6 stammt aus dem Journal *Strahlentherapie und Onkologie* des Herausgebers Springer Nature. Das Copyright liegt bei den Autoren und unterliegt einer Creative Commons Lizenz (CC BY 4.0; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Die Quelle und

Modifikationen wurden kenntlich gemacht. Zusätzlich wurde das Einverständnis der korrespondierenden Autoren eingeholt.

Abbildung 9:

Die Abbildung 9 entstammt dem Journal *JAMA Facial Plastic Surgery* des Herausgebers Mary Ann Liebert, Inc. Unter der Lizenznummer 1179781-1 erfolgte die freundliche Erlaubnis zur Nutzung der Abbildungen für einen nicht-kommerziellen Zweck. Die Quelle und Modifikationen wurden kenntlich gemacht. Zusätzlich wurde das Einverständnis der korrespondierenden Autoren eingeholt.

6.3 Tabellen

Tabelle 1: Tumorcharakteristik und Ergebnisse der Abstrich- und Mundspüldiagnostik zur HPV-DNA-Diagnostik, modifiziert nach (35) 5

7 Danksagung

Zuerst danke ich sehr herzlich Herrn Prof. Dr. Alexander Berghaus, unter dessen Klinikleitung meine wissenschaftliche Arbeit begann und der mir hier ein motivierendes Umfeld zu Beginn meiner Facharztweiterbildung geboten hat.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Martin Canis ganz herzlich für die kontinuierliche Betreuung und Beratung seit der Promotionsarbeit bis hin zur Geschäftsführung des Fachmentorats zur Habilitation danken. Daneben möchte ich Herrn Prof. Dr. Claus Belka und Herrn Prof. Dr. Philipp Baumeister für die Begleitung im Fachmentorat zur Habilitation und für die kritische und konstruktive Auseinandersetzung mit meiner Arbeit herzlich danken.

Ohne die Zusammenarbeit mit vielen weiteren Mentoren wie Herrn Prof. Dr. Olivier Gires, Herrn Prof. Dr. Frank Haubner, Herrn Prof. Dr. Fritz Ihler, Herrn Prof. Dr. Joachim Müller sowie Herrn Prof. Dr. Christoph Reichel, vielen Kolleginnen und Kollegen wie Herrn Dr. Axel Lechner, Herrn Dr. Ivo Grüniger, Herrn Priv.-Doz. Dr. Mattis Bertlich, Frau Axelle Felicio-Briegel, Herrn Dr. Florian Schrözlmaier, Herrn Priv.-Doz. Dr. Bernhard Weiß, Frau Priv.-Doz. Dr. Jennifer Spiegel, Herr Dr. Bernd Uhl, Frau Priv.-Doz. Dr. Donata Gellrich, Herrn Priv.-Doz. Dr. Moritz Gröger, Herrn Michael Wustrow, Frau Dr. Fatemeh Kashani, Frau Prof. Dr. Maria Schuster, Frau Dr. Magdalena Widmann, Frau Priv.-Doz. Dr. Veronika Volgger, Herrn Priv.-Doz. Dr. John-Martin Hempel, Herrn Dr. Robert Wiebringhaus sowie Herrn Prof. Dr. Mark Jakob, den Doktorandinnen Frau Annalena Hilpert sowie Frau Antonia Kleinsasser und ganz besonders auch dem Doktorand und zwischenzeitlich Kollegen Herrn Stefan Haider, dem Labor-Team um Frau Sabina Schwenk-Zieger, Frau Gisela Kranz und Herrn Darko Libl ebenso wie Kooperationspartnerinnen und -partnern wie Frau Prof. Dr. Julia Gallwas, Frau Dr. Tanja Eggersmann, Frau Dr. Johanna Huber, Herr Priv.-Doz. Dr. Markus Schirmer, Frau Dr. Julia Kitz sowie Ass.-Prof. Sam Payabvash, MD wäre diese Habilitation nicht möglich gewesen. Ich bin Ihnen ebenso wie den vielen anderen Wegbegleiterinnen und Wegbegleitern am LMU Klinikum außerordentlich dankbar.

Mein unermesslicher Dank gilt meiner Familie, zuvorderst Christina, Mathilda, Samy und meinen Eltern sowie Freunden, die mich während des gesamten Weges bis nun zur Habilitation unterstützt haben.

8 Schriftenverzeichnis der zugrundeliegenden Originalarbeiten

Eggersmann TK, **Sharaf K**, Baumeister P, Thaler C, Dannecker CJ, Jeschke U, Mahner S, Weyerstahl K, Weyerstahl T, Bergauer F, Gallwas JKS (2019) Prevalence of oral HPV infection in cervical HPV positive women and their sexual partners. *Arch Gynecol Obstet*. DOI 10.1007/s00404-019-05135-7 JIF 2,28

Eggersmann TK, Baumeister P, Kumbrink J, Mayr D, Schmoeckel E, Thaler C, Dannecker CJ, Jeschke U, Nagler T, Mahner S, **Sharaf K** *, Gallwas JKS * (2020) Oropharyngeal HPV Detection Techniques in HPV-associated Head and Neck Cancer Patients. *Anticancer Res*. DOI 10.21873/anticancer.14170 JIF 2,48

Haider SP, Mahajan A, Zeevi T, Baumeister P, Reichel C, **Sharaf K**, Forghani R, Kucukkaya AS, Kann BH, Judson BL, Prasad ML, Burtness B, Payabvash S (2020) PET/CT Radiomics Signature of Human Papilloma Virus Association in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* DOI 10.1007/s00259-020-04839-2 JIF 9,24

Haider SP, Zeevi T, Baumeister P, Reichel C, **Sharaf K**, Forghani R, Kann BH, Judson BL, Prasad ML, Burtness B, Mahajan A *, Payabvash S * (2020) Potential Added Value of PET/CT Radiomics for Survival Prognostication beyond AJCC 8th Edition Staging in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma *Cancers* DOI 10.3390/cancers12071778 JIF 6,64

Haider SP *, **Sharaf K** *, Zeevi T, Baumeister P, Reichel C, Forghani R, Kann BH, Petukhova A, Judson BL, Prasad ML, Liu C, Burtness B, Mahajan A, Payabvash S (2020) Prediction of post-radiotherapy locoregional progression in HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma using machine-learning analysis of baseline PET/CT radiomics *Translational Oncology* DOI 10.1016/j.tranon.2020.100906 JIF 4,24

Jakob M *, **Sharaf K** *, Schirmer M, Leu M, Küffer S, Bertlich M, Ihler F, Haubner F, Canis M, Kitz J (2020) Role of Cancer Stem Cell Markers ALDH1, BCL11B, BMI-1, and CD44 in the Prognosis of Advanced HNSCC. *Strahlenther Onkol*. DOI 10.1007/s00066-020-01653-5 JIF 3,62

Sharaf K, Lechner A, Haider SP, Walz C, Kranz G, Canis M, Haubner F, Gires O, Baumeister P (2021) Discrimination of cancer stem cell markers ALDH1, BCL11B, BMI-1, and CD44 in different tissues of HNSCC patients *Current Oncology* DOI 10.3390/currenol28040241 JIF 3,11

Sharaf K *, Kleinsasser A *, Schwenk-Zieger S, Gires O, Schinke H, Kohlbauer V, Jakob M, Canis M, Haubner F (2019) Molecular Characterization of Lipoaspirates Used in Regenerative Head and Neck Surgery. *JAMA Facial Plast Surg*. DOI 10.1001/jamafacial.2019.0851 JIF 3,79

Sharaf K, Eggersmann TK, Haider SP, Schwenk-Zieger S, Zhou J, Gires O, Lechner A, Canis M, Haubner F (2021) Human adipose-derived stem/stromal cells promote proliferation and migration in head and neck cancer cells *Cancers* DOI 10.3390/cancers13112751 JIF 6,58

* Geteilte Autorschaft

9 Anhänge (zugrundeliegende Originalarbeiten)

Aufgrund des Urheberrechts können einzelne der zugrundeliegenden Arbeiten nicht in Gänze abgedruckt werden, so dass ein Abdruck der Arbeiten nicht erfolgt. Alle Arbeiten lassen sich jedoch über die auf der vorherigen Seite genannten „Digital Object Identifier“ (DOI) finden und abrufen.