

**Aus dem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. med. dent. J. E. Zöller**

**Die multimodale Therapie des lokal fortgeschrittenen  
Mundhöhlenkarzinoms unter Berücksichtigung der  
prognostischen Relevanz einer Podoplanin Expression.**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Dennis Akuamoa-Boateng  
aus Dortmund

**promoviert am 20. September 2022**

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln**

**Druckjahr 2022**

**Dekan:** **Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink**  
**1. Gutachter:** **Professor Dr. med. Dr. med. dent. M. P. Kreppel**  
**2. Gutachter:** **Universitätsprofessor Dr. med. J. P. Klußmann**

#### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

**Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. Matthias Peter Kreppel, Frau Andrea Salmon** und der Forschungsgruppe von **Herrn Professor Dr. rer. nat. Jochen Hess**.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden anonymisierten Datensätze und Informationen zu histopathologischen Markern und deren Expressionsmustern wurden für mein Dissertationsprojekt in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie durch Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. Matthias Peter Kreppel zur Verfügung gestellt. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden mit Unterstützung von Frau Andrea Salmon und Herrn Professor Dr. rer. Nat. Jochen Hess durchgeführt. Die radioonkologischen Informationen bezüglich der Behandlungskonzepte konnten durch mich interpretiert werden. Die verwendeten Datensätze wurden von mir zur statistischen Auswertung in einer Datenbank aufgearbeitet und analysiert.

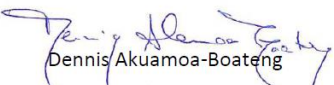
In der folgenden Arbeit wird bei der maskulin konnotierten Begriffsverwendung „Patient“ und des Plurals „Patienten“ sowie weiterer Begrifflichkeiten die Wortbedeutung als erweiterte Begriffsfassung unter Einschluss der männlichen, weiblichen und diversen Individuen zu „Patient und Patientin“ bzw. „Patienten und Patientinnen“ gemeint und bedient sich in der Begriffswahl einer gekürzten Form zur Vereinfachung des Leseflusses.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 19.04.2022

Unterschrift:

  
Dennis Akuamo-Boateng

## Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. Matthias Peter Kreppel aussprechen, der mich bereits als Famulant nachhaltig für die chirurgische Onkologie begeistern konnte und neben der intensiven klinischen Patientenversorgung jederzeit mit fachlicher Unterstützung, Ideen und dem Vertrauen in das Projekt die Durchführung dieser Arbeit maßgeblich ermöglicht hat.

Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. med. dent. Martin Scheer danke ich für die Möglichkeit, als Student die wissenschaftlichen Grundlagen im Labor zu erlernen. Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Dr. med. dent. Joachim E. Zöller danke ich dafür, stets ein großartiges interdisziplinäres Team geführt und geleitet zu haben und mir den Zugang zu der Infrastruktur des zahnmedizinischen Labors und der tatkräftigen Unterstützung von Frau Andrea Salmon ermöglicht zu haben.

Dem ärztlichen und wissenschaftlichen Team des Instituts für Pathologie der Universität zu Köln und der Forschungsgruppe von Herrn Professor Dr. rer. nat. Jochen Hess gilt ein großer Dank für die Unterstützung zur Interpretation immunhistochemischer Färbungen.

Für die Motivation, das Aufmuntern, Anfeuern und Ermutigen gilt mein Dank meiner Familie – insbesondere meinem verstorbenen Vater Privatdozent Dr. med. Dr. med. dent. Emmanuel Akuamo-Boateng, der meine Bewunderung für Ästhetik, Chirurgie, Funktionserhalt und Onkologie sowie als Vorbild im Berufsbild des Arztes von Kindesbeinen an den Grundstein für meinen gesamten Werdegang gelegt hat.

Besonders möchte ich meiner Freundin Regina für das unermüdliche Stärken des Rückens, das intensive Korrekturlesen der Arbeit zu jeder Tages- und Nachtzeit, sowie für die unentwegte persönliche Unterstützung auf der Reise zu diesem Meilenstein danken.

## **Widmung**

Gewidmet

dem Atem des Teutoburger Waldes - der Heimat, die erdet.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
2.1	Das Mundhöhlenkarzinom.....	9
2.1.1	TNM- und UICC-Klassifikation .....	10
2.1.2	Risikofaktoren Rauchen, Alkohol und Humanes Papilloma Virus (HPV) .....	11
2.1.3	Humanes Papilloma Virus (HPV) .....	11
2.2	Biomarker bei Karzinomen der Kopf-Hals Region.....	12
2.2.1	Molekularpathologische Faktoren der Tumorgenese .....	12
2.3	Zielsetzung der Arbeit .....	17
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1	Behandlungsablauf.....	19
3.2	Operation .....	19
3.3	Adjuvante Behandlung: Radiotherapie und Radiochemotherapie .....	19
3.4	Datenerhebung .....	20
3.4.1	Präparate Auswahl.....	20
3.4.2	Immunhistochemische Färbungen .....	20
3.4.3	Immunhistochemie .....	21
3.4.4	SMR3A .....	24
3.4.5	Humanes Papillomavirus (HPV) und p16 Immunhistochemische Färbung .....	25
3.5	Statistische Auswertung .....	26
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>
4.1	Deskriptive Statistik .....	27
4.1.1	Alter, Geschlecht und Tumorlokalisation.....	27
4.1.2	Alkohol, Rauchen und HPV .....	28
4.1.3	Histologischer Grad der Differenzierung, TNM-Klassifikation & UICC-Stadien ..	29
4.2	Therapie .....	31
4.2.1	Adjuvante Therapie .....	31
4.2.2	Podoplanin .....	33
4.2.3	Subgruppe mit Untersuchung einer SMR3A-Expression .....	34
4.3	Gesamtüberleben.....	37
4.3.1	Geschlecht .....	37
4.3.2	Alter .....	37
4.3.3	Alkohol, Rauchen und HPV-Status .....	38
4.3.4	Histologischer Grad der Differenzierung, TNM-Status und UICC-Stadien .....	40
4.3.5	Adjuvante Therapie .....	46
4.3.6	Bestrahlungsdosis .....	46
4.3.7	Molekularpathologische Untersuchungen.....	47
4.3.8	Multiple Lineare Regressionsanalyse.....	52
4.4	Erkrankungsfreies Überleben.....	53
4.4.1	Geschlecht .....	53
4.4.2	Alter .....	54
4.4.3	Alkohol, Rauchen und HPV-Status .....	54
4.4.4	Histologischer Grad der Differenzierung, TNM-Status & UICC-Stadien.....	56

4.4.5	Adjuvante Therapie .....	61
4.4.6	Bestrahlungsdosis .....	62
4.4.7	Molekularpathologische Untersuchungen.....	63
4.4.8	Multiple Lineare Regressionsanalyse.....	68
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>69</b>
5.1	Einführung in die Diskussion .....	69
5.2	Therapieoptionen bei fortgeschrittenen Stadien .....	69
5.2.1	Histopathologische Risikofaktoren .....	70
5.2.2	Lymphangiosis und Lymphknotenbefall .....	72
5.2.3	Adjuvante Therapie .....	74
5.3	Humane Papillomaviren, Rauchen und Alkohol .....	79
5.4	Biomarker .....	83
5.4.1	Podoplanin .....	83
5.4.2	Moesin.....	86
5.4.3	SMR3A .....	87
<b>6</b>	<b>Limitation und Ausblick .....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>100</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis .....	100
8.2	Tabellenverzeichnis .....	100
<b>9</b>	<b>Vorabveröffentlichung von Ergebnissen.....</b>	<b>101</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Enzym-Komplex-Methode
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Bp	Basenpaare
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAB	Diaminbenzidin-Tetrahydrochlorid
DFS	Disease Free Survival = Erkrankungsfreies Überleben
DNA	Desoxyribonukleinacid
ED	Einzeldosis
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
EMT	Epithel to Mesenchym Transition
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
GRD	Gesamtreferenzdosis
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin
HR	Hazard Ratio
HPV	Humane Papillomviren
IMSIE	Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
KOF	Körperoberfläche
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTX	Methotrexat
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
OS	Overall Survival = Gesamtüberleben
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandin E2
PKM2	Pyruvat Kinase Muscle Isozyme 2
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SWOG	Southwest Oncology Group
TGF- $\alpha$	Transforming Growth Factor Alpha
TNM	Tumor Node Metastasis = Tumor Lymphknoten Metastasierung
UICC	Union International Contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
5-FU	5-Fluorouracil



# 1 Zusammenfassung

Trotz erheblicher Verbesserungen im prätherapeutischen Staging, Erkenntnissen auf Genmodulatorischer Ebene, sowie der vermehrten Erforschung und Verwendung moderner Medikamentengruppen innerhalb multimodaler Behandlungsregime, bleibt die Prognose von Mundhöhlenkarzinomen im Rahmen kurativer Behandlungen unbefriedigend.

Untersuchungen verlässlicher Biomarker und deren Integrierung in die klinische prä- und peritherapeutische Diagnostik könnten im Hinblick auf die Prognosestratifizierung relevant dazu beitragen Patienten mit erhöhtem Risiko für Therapieversagen zu identifizieren. Dadurch könnten Kollektive für Therapie-Deeskalationen oder -Intensivierungen erkannt werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine anonymisierte retrospektive Auswertung von 80 konsekutiv behandelten Patienten mit Mundhöhlenkarzinom der Stadien I-IV durchgeführt. Alle Patienten erhielten eine kurativ intendierte radikale Tumoroperation in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik zu Köln zwischen Oktober 2002 und Juni 2005 gefolgt von leitliniengerechter adjuvanter radioonkologischer Therapie. Histopathologische Ergebnisse wurden um das Expressionsverhalten von Podoplanin, SMR3A, Moesin, EGFR, COX-2, PKM2 und p16 ergänzt. Als klinische Endpunkte wurden das *Gesamtüberleben* und *erkrankungsfreie Überleben* betrachtet.

Eine risikoadjustierte adjuvante Therapie scheint bei fortgeschrittenen Mundhöhlenkarzinomen das Risiko für Therapieversagen nur teilweise kompensieren zu können. Risikofaktoren zur Einleitung adjuvanter Behandlungen lagen vor bei Lymphangiosis ( $p=0.023$ ), nodalem Befall ( $p=0.000$ ), extranodaler Extension ( $p=0.012$ ), unvollständiger Resektion ( $p=0.081$ ), hohem T- ( $p<0.001$ ) und UICC-Stadium ( $p<0.001$ ). Ein prognostisch günstiger Einfluss des HPV-Status bezüglich des Gesamtüberlebens ( $p=0.790$ ) und erkrankungsfreien Überlebens ( $p=0.519$ ) lassen sich nicht nachweisen und steht im Gegensatz zum derzeitigen Forschungsgegenstand bei Oropharynxkarzinomen. Für EGFR, VEGF, COX-2 und PKM2 können keine Einflüsse bezüglich der klinischen Endpunkte nachgewiesen werden. Allerdings zeigen Moesin, SMR3A und Podoplanin mit steigenden Expressionsgraden eine Entwicklung von De-differenzierung, lokaler Invasion, hoher UICC-Stadien, Lymphknotenmetastasen und extranodaler Extension.

In der multiplen linearen Regressionsanalyse besitzen hohe Expressionslevel von SMR3A ( $p=0.002$ ), Moesin ( $p=0.024$ ) und Podoplanin ( $p=0.004$ ) unabhängige signifikante Einflüsse auf das Gesamtüberleben. Für Podoplanin ( $p<0.001$ ) und Moesin ( $p=0.023$ ) zeigen sich außerdem klinisch aggressivere Verläufe mit einem signifikant verkürzten erkrankungsfreien Überleben. Der immunhistochemische Nachweis dieser Biomarker könnte dazu geeignet sein, frühzeitig ungünstige klinische Verläufe mit dem Risiko für Therapieversagen zu detektieren.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Mundhöhlenkarzinom

Im Jahr 2020 belief sich die kumulierte Krebsinzidenz auf 18,09 Millionen Erkrankungen mit einer Mortalität von 9,89 Millionen. Hierbei entfallen 4,6% der neudiagnostizierten Fälle auf den Kopf-Hals Bereich und verursachen 4,5% der tumorspezifischen Mortalität [123].

Tumoren der Kopf-Hals Region liegen an sechster Stelle aller malignen Erkrankungen und umfassen Tumoren der Lippe und Mundhöhle, des Kehlkopfes, sowie des Naso-, Oro- und Hypopharynx [113]. Dabei ist das Mundhöhlenkarzinom bei Männern die fünfthäufigste und bei Frauen die 15. häufigste maligne Erkrankung [33]. Insgesamt besitzen Männer ein bis zu vierfach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Kopf-Hals-Karzinomen [39] und erkranken mit einem Lebenszeitrisko von 0,66% häufiger als Frauen mit 0,26% [41]. Allerdings konnte in den letzten Jahren bei Frauen ein Anstieg beobachtet werden [24]. Maligne Erkrankungen der Lippe und Mundhöhle [35] sind die häufigste Tumorvariante der Kopf-Hals-Karzinome und verursachen 1% der globalen krebsbedingten Todesfälle. Es bestehen regionale Unterschiede in der Häufigkeit des Erkrankungsauftritts.

Im Jahr 2018 entfielen europaweit 3,81% aller Krebsneuerkrankungen und 3,74% der malignomassoziierten Mortalität auf Kopf-Hals-Tumoren inklusive Speicheldrüsentumoren. Dies entspricht 161.200 bzw. 72.700 Menschen [140]. Dem gegenüber gestellt werden im Jahr 2020 in den Vereinigten Staaten von Amerika 53.260 neudiagnostizierte Kopf-Hals-Tumore und eine absolute Mortalität von 10.750 Fällen [117].

Obwohl die anatomischen Regionen in enger lokaler Beziehung stehen, unterscheiden sich die Tumoren bezüglich der Ätiologie, Histologie, Diagnostik, Klassifizierung, therapeutischen Ansätzen und Prognose deutlich voneinander [39].

Etwa 91% der Kopf-Hals-Karzinome sind plattenepithelialen Ursprungs, 2 % sarkomatoid und die weiteren 7% Adenokarzinome, Melanome und weitere nicht näher spezifizierte histologische Varianten [4, 95]. Die tumorspezifischen 5-Jahres-Überlebensraten variieren stark in Abhängigkeit der primären Tumorlokalisation und des Tumorstadiums. Bei Patienten mit Oropharynxkarzinomen werden in aktuellen Studien über alle Tumorstadien hinweg 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 45-58% angegeben [32]. Für Plattenepithelkarzinome des Larynx werden 41% und des Hypopharynx 25% berichtet [17]. Die Prognose für fortgeschrittene Mundhöhlenkarzinome wird deutlich schlechter berichtet, insbesondere, da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits mehr als die Hälfte der Patienten regionäre Lymphknotenmetastasen aufweisen; dies führt zu einer erhöhten Malignom assoziierten Letalität von bis zu 50% [15]. Mundhöhlenkarzinome weisen trotz multimodaler Therapiekonzepte und erheblicher

Fortschritte der Chirurgie, Radiotherapie und medikamentösen Tumortherapie in den letzten Jahrzehnten keine signifikanten Verbesserungen im Gesamtüberleben auf [32, 87].

Ein besonders hohes Risiko für Therapieversagen, lokoregionäre Rezidive und Fernmetastasierungen trotz primär erfolgreicher chirurgischer Resektion besteht insbesondere bei mikroskopischen Tumorresiduen im Resektionsrandbereich, regionärer Lymphknotenmetastasierung, extranodaler Tumorextension und Perineuralscheideninvasion [50, 147].

### **2.1.1 TNM- und UICC-Klassifikation**

Die Behandlung von Mundkarzinomen in Deutschland richtet sich nach den Empfehlungen der nationalen S3-Leitlinie. Diese liegt aktuell als Version 3.0-2021 vor und wird von der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie konzipiert [8]. Die Empfehlungen zur Behandlungsplanung und Therapiestratifizierung von Tumoren der Kopf-Hals-Region orientieren sich primär an klinisch-pathologischen Beschreibungen analog der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) und Stagingkriterien entsprechend der *Tumor Node Metastasis* (TNM)-Klassifikation.

Der TNM-Klassifikation in derzeit achter Auflage aus dem Jahr 2017 liegen statistische Beobachtungen zugrunde, die eine Korrelation der Prognose und der Ausbreitung des Primärtumors (*T-Klassifikation*), der Ausdehnung regionärer Lymphknotenmetastasen (*N-Klassifikation*) sowie den Status der Fernmetastasen (*M-Klassifikation*) beschreiben [51].

Als UICC-Tumorstadien werden verschiedene TNM-Kombinationen mit ähnlicher Prognose stratifiziert und gruppiert.

Moderne Forschungsergebnisse liefern Hinweise auf eine zusätzliche Relevanz spezifischer tumorbiologischer Einflüsse auf Grundlage viraler, molekularer und genetischer Faktoren und Alterationen in der biologischen Aggressivität der Erkrankungen. Bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung könnten Faktoren detektiert werden, die prognostische Relevanz für Therapieplanung und Behandlungsansprechen besitzen [46, 48]. Im Jahr 2017 führte die Unterscheidung von HPV-assoziierten und negativen Oropharynxkarzinomen zu einer Novellierung der nodalen Beurteilung innerhalb der TNM-Klassifikation. Für Mundhöhlenkarzinome werden tumorspezifische Charakteristika bislang unzureichend innerhalb der Klassifikationssysteme und Therapieempfehlungen berücksichtigt.

### **2.1.2 Risikofaktoren Rauchen, Alkohol und Humanes Papilloma Virus (HPV)**

Rauchen und Alkohol gelten als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen und wirken in der primären und sekundären Karzinogenese bei gleichzeitiger Exposition in ihrer schädigenden Wirkung potenzierend [82].

Tabak in rauchhaltiger oder rauchfreier Form konnte als der wichtigste unabhängige Risikofaktor zur Entwicklung von Kopf-Hals-Karzinomen und Tumoren des Aerodigestivtraktes identifiziert werden. Daneben stellt Alkoholkonsum einen weiteren unabhängigen Risikofaktor der Karzinogenese dar [80]. Infektionen mit *Humanen Papillomaviren* (HPV) konnten separat als kausale Ursache für die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen werden und zeigten in den vergangenen Jahren eine stetig ansteigende Inzidenz [41]. Dies lässt vermuten, dass eine Untergruppe von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen Eigenschaften sexuell übertragbarer Krankheiten mit unterschiedlicher Pathogenese und klinischen Merkmalen aufweisen [120].

Diese HPV-assoziierten primären und sekundären Malignome treten vorrangig in der Region des Oropharynx auf und werden gehäuft bei einem jüngeren Patientenkollektiv diagnostiziert [79]. Aufgrund der günstigeren Prognose werden derzeit multimodale de-eskalative Behandlungsverfahren HPV-assoziiierter Tumore in Studien untersucht [105] mit dem Ziel therapieassoziierte Langzeittoxizitäten zu reduzieren [46].

### **2.1.3 Humanes Papilloma Virus (HPV)**

Humane Papilloma Viren sind zirkuläre Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom mit circa 8.000 Basenpaaren. Sie besitzen acht bis neun Areale mit offenen Leserahmen, die für die virale Replikation, Transkription und Hilfsproteine codieren, sowie den Einbau in das Wirtsgenom ermöglichen [84].

Anhand ihres onkogenen Potenzials werden low-risk und high-risk Subtypen unterschieden [72]. Die Onkoproteinaktivität von E6 und E7 der HPV Subtypen 16, 18 und 31 und deren Einflüsse auf den Zellregulationsmechanismus modulieren zellulär über p16Ink4a [110]. P16Ink4a kann als Inhibitor der zyklinabhängigen Kinase 4 den Zellzyklus regulieren und führt über eine Phosphorylierung des Retinoblastom-Tumorsuppressorgens *pRB* zum Wegfall der Transkriptionsfaktorhemmung von E2F. Hierüber wird der Zellzyklus von der G1-Phase in die S-Phase katalysiert [88].

In den vergangenen Dekaden konnte ein kausaler Einfluss einer HPV-Infektion im Rahmen der Entwicklung von Präkanzerosen nachgewiesen werden. Global wird in bis zu 4,8% aller Tumorneuerkrankungen eine HPV-Assoziation vermutet [16].

Diese konnte insbesondere bei urogenitalen und anorektalen Malignomen sowie Tumoren der oberen Atemwege nachgewiesen werden [72]. Eine Vielzahl der Infektionen ist innerhalb von zwei Jahren selbstlimitierend [16], während die HPV Subtypen 16, 18 und 31 über eine Latenz von bis zu zehn Jahren eine Progredienz in invasive Tumoren zeigen können [102].

Bei der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren konnte der Einfluss von oralen HPV-Infektionen und auf die tumorspezifische Prognose untersucht werden. Hierbei wiesen Oropharynxkarzinome mit 75-85% eine gehäufte HPV-Assoziation auf [59]. Mundhöhlenkarzinome gehören unter den Nicht-Oropharynxkarzinomen mit 10-25% zu den häufigsten HPV-assoziierten Malignomen [52].

## **2.2 Biomarker bei Karzinomen der Kopf-Hals Region**

Die Onkogenese von Kopf-Hals-Tumoren gilt als multifaktorielles Geschehen und basiert vorrangig auf Veränderungen Zellzyklus-regulierender Gene [31]. Hierbei spielen Mitogenaktivität, Signalwegveränderungen, Angiogenese und Apoptose entscheidende Rollen, welche die Entwicklung von Dysplasien, prämaligen Läsionen und invasiven Karzinomen begünstigen können [83].

Es konnten einige zytogenetische Variationen in Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen werden, die einen Einfluss auf Mikrosatellitenstabilität [69], Regulation von Tumorsuppressor-Genen und Treibermutationen besitzen. Daneben können mitogene Signalwege Veränderungen an Zelloberflächenrezeptoren, Signalmolekülen und Transmembranrezeptoren sowie deren Bindungsproteinen induzieren [93].

### **2.2.1 Molekularpathologische Faktoren der Tumorgenese**

Untersuchungen molekularpathologischer Faktoren und deren Einflüsse bezüglich der Tumorentstehung und Tumorausdehnung sind zentrale Aspekte translationaler und klinischer Forschungen.

Im Rahmen der Prognosestratifikation konnten Veränderungen biochemischer Strukturen herausgestellt und untersucht werden, die sich als Ziele für Diagnostik und therapeutische Behandlungen eignen können [34].

Im Folgenden wird auf die Biomarker *EGFR*, *VEGF*, *Moesin*, *COX-2* und *PKM2* eingegangen sowie die in der vorliegenden Arbeit nähergehend untersuchten Strukturen *SMR3A* und *Podoplanin* erarbeitet.

### **2.2.1.1 EGFR**

Kopf-Hals-Karzinome besitzen eine erhöhte Expression des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) und seinem Liganden *Transforming Growth Factor Alpha* (TGF- $\alpha$ ) [28]. EGFR kann in 90% der Kopf-Hals-Karzinome nachgewiesen werden [128] und gehört zu dem Stamm der ErbB-Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Kontinuierliche TGF- $\alpha$  Expressionslevel können bereits in der Frühphase milder Dysplasien nachgewiesen werden [43]. Die EGFR-Expression steigt mit Zunahme des Grades der Dysplasie und kann bei invasiven Karzinomen auch im peritumoralen Gewebemilieu detektiert werden [116], wobei eine Überexpression mit schlechter klinischer Prognose in Bezug auf Gesamtüberleben und Tumorkontrolle korreliert. Gleichzeitig bieten diese Tumore die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie [128].

### **2.2.1.2 VEGF**

*Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist ein Zytokin, das sowohl physiologisch als auch während der Tumorgenese über seine sieben Isoformen VEGF-A bis VEGF-F eine Blutgefäß- und Lymphgefäßneubildung induzieren kann. Dieses pro-angiogenetische Verhalten fördert Entartung, Tumorstadium, Invasion und Metastasierung [71].

VEGF bindet primär über zwei Tyrosin-Kinase-Rezeptoren an Flt-1 und Flk-1, die in Endothelzellen, Makrophagen, Osteoblasten und Monozyten vorkommen [115]. Durch Flt-1 wird die Beweglichkeit von Endothelzellen, Makrophagen und Monozyten induziert [29]. Flk-1 fördert das Endothelwachstum, die Gefäßpermeabilität und Osteoklastenbildung und kann somit indirekt die Osteodestruktion und Knocheninvasion beeinflussen [122].

### **2.2.1.3 Moesin**

Moesin gehört zu der *Ezrin-Radixin-Moesin* (ERM) Familie, die zu 70-80% aus identischen Aminosäuresequenzen bestehen. Diese können invasives Wachstum durch Modulation der Aktinfilamentstruktur induzieren, wobei Glykoproteine wie Podoplanin eine zentrale Rolle spielen [10].

Die Zytoplasma Expression von Moesin wurde bei der malignen Transformation oraler Epithelzellen vermehrt nachgewiesen und korreliert sowohl mit Invasion, Lymphknotenmetastasierung und reduzierter Prognose bei Mundhöhlen- [10], Larynx- [137] und Lippenkarzinomen [7].

#### 2.2.1.4 PKM2

Die *Pyruvat Kinase* (PK) ist ein Enzym, das an der Glykolyse beteiligt ist und mit seiner metabolischen Aktivität zur Energiegewinnung beiträgt. Dazu ist es in der Lage eine Phosphatgruppe aus Phosphoenolpyruvat unter der Bildung von Pyruvat auf *Adenosin-Diphosphat* (ADP) zu übertragen und damit *Adenosintriphosphat* (ATP) bereitzustellen [3]. Diese als Warburg Effekt bezeichnete metabolische Reaktion kann auch im hypoxischen Milieu nachgewiesen werden [138]. Als *Pyruvate Kinase Muscle Isozyme M2* (PKM2) wird hierbei, neben *L*, *R* und *M1* [47] eine von vier in Säugetieren bekannte Isoform bezeichnet [30, 126].

#### 2.2.1.5 COX-2

*Cyclooxygenase-2* (COX-2) induziert bei Kopf-Hals-Tumoren inflammatorische Prozesse [2], indem Arachidonsäure zu Prostaglandin verstoffwechselt wird [130].

Über *Prostaglandin E2* (PGE<sub>2</sub>), das über seine oberflächlichen G-protein-gebundenen Rezeptoren *EP1*, *EP2*, *EP3* und *EP4* wirkt, induziert COX-2 die Zell-Proliferation, Angiogenese, Invasion und Metastasierung. COX-2 wirkt sowohl über Veränderung der Extrazellulärmatrixbindung als auch über die Apoptosehemmung und kann die Antwort von Wachstumsregulationssignalen modifizieren. Eine Überexpression von COX-2 wirkt über die Hochregulation des anti-apoptotischen Bcl-2 Proteins prokanzerogen [114]. Es kann durch TGF<sub>2</sub>-Inhibierung und reduzierte E-Cadherin Expression die Eliminierung abnormer Zellen modulieren [134]. COX-2 konnte bei Kolon-, Magen-, Mamma-, Lungen-, Ösophagus-, Pankreas-, Urothel-, Prostata- und Hautkarzinomen nachgewiesen werden [44].

#### 2.2.1.6 Podoplanin

In den vergangenen Jahren war Podoplanin und dessen Involvierung im Rahmen der Karzinogenese Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Ursprünglich wurde Podoplanin als Marker der glomerulären Epithelzellen *Podozyten* identifiziert, wovon sich der Name strukturell ableitet [18]. Daneben ist Podoplanin als *T1a-2* Marker für alveoläre Epithelzellen [101] sowie als *PA2.26* und *OTS-8* in epidermalen Keratinozyten während der Wundheilung und chemischen Karzinogenese mit *Phorbol-12-Myristat-13-Acetat* bekannt [111].

Während die vollständige physiologische Funktion unzureichend bekannt ist, lässt sich im Tumorgenesemodell von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle eine Schlüsselrolle von Podoplanin auf zellulärer Ebene aufzeigen [63].

#### **2.2.1.6.1 Podoplanin im Mausmodell**

Im Mausmodell fördert Podoplanin die epidermale Zellproliferation [38] und konnte als spezifischer Marker lymphatischer Endothelzellen identifiziert werden. Knock-out Mäuse erleiden aufgrund dilatierter, krankhaft veränderter Lymphgefäße Lymphödeme, alveoläre Fehlbildungen und konsekutive respiratorische Insuffizienzen [99], welche letale Defekte des lymphatischen Gefäßsystems [107] zur Folge haben.

#### **2.2.1.6.2 Humanes Podoplanin**

Das humane Podoplanin ist ein 38 kDa großes Typ-1 transmembranöses Glykoprotein, das aus 162 Aminosäuren besteht [141]. Die gesamte Gensequenz setzt sich aus 717 bp zusammen [64]. Die Proteinstruktur wird aus zwei mRNAs, von denen beide die kodierende Sequenz enthalten, durch alternative Polyadenylierung synthetisiert [78].

Aus neun der insgesamt 162 Aminosäuren wird die intrazelluläre Domäne gebildet. Die extrazelluläre Domäne ist stark O-glykolisiert und mit Sialinsäuren über die Bindungsstelle  $\alpha$ -2,3 mit Galaktose verbunden. Diese Einheit bildet den Hauptteil der C-terminalen Hälfte des Proteins [141]. Eine physiologische Expression von Podoplanin konnte in umschriebenen Gebieten der Basalschicht humaner Epidermis nachgewiesen werden und lässt eine Schlüsselrolle in der Zellproliferation nach epidermaler Verletzung vermuten [106].

#### **2.2.1.6.3 Podoplanin und humane Tumoren**

Es wird vermutet, dass Podoplanin bei der Tumorgenese und in der lymphatischen Invasion metastasierender Tumorzellen, durch die Beeinflussung der Tumorpheriferation und Zelldifferenzierung involviert ist. Podoplanin konnte in 80% der humanen Plattenepithelkarzinome nachgewiesen werden, wobei es häufig in einer einzelligen Schicht exprimiert vorkommt [142]. Zellen, die von Sarkomen, embryonalen Karzinomen, Plattenepithelkarzinomen und Endometriumkarzinomen abstammen, zeigen fokale vermehrte Podoplanin-Expression. In Zelllinien, die von Kolon-, Pankreas-, Ovarial- und duktalem Mammakarzinomen abstammen, lassen sich dagegen keine Transkripte nachweisen [76, 77, 98].



#### **2.2.1.6.4 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)**

Während einer Epithelial-mesenchymalen Transition (*EMT*) wird die Zellstruktur über epithelspezifische Proteine, wie beispielsweise E-Cadherine, Catenine und Zytokeratine, variiert und reorganisiert [112].

Progressionsfördernde mesenchymale Moleküle wie Vimentin, Fibronectin und Cadherine werden während einer EMT moduliert, vermehrt exprimiert oder re-exprimiert [76].

Gesteigerte Zell-Zell Kontaktlösungen und Zunahmen der Zellmotilität beeinflussen die Invasion in peritumoröses Gewebe. Dabei ist Podoplanin in der Lage Zellverbände auch ohne eine E-Cadherin vermittelte Zelllösung zu regulieren [97]. Dazu wird die Bildung von Filopodien durch Modulierung der Aktivität der Rho-familiären GTPasen induziert. Diese Modifikation kann zu kollektiver Zellmigration, Zellinvasion und Metastasierung führen [142]. Sie ist abhängig von der Bindung des zytoskelettmembranständigen Bindungsproteins Ezrin an die zytoplasmatische Domäne von Podoplanin, wodurch es zu einer Aktivierung der RhoA GTPase kommt [99, 111].

RhoA induziert VEGF, initiiert die Bildung kapillärer Netzwerke, sowie lymphatischer endothelialer Zellverbände und kann durch Podoplanin in der Aktivität moduliert werden [67].

#### **2.2.1.6.5 Nicht Epithelial-mesenchymale Transition (Non-EMT)**

Biochemisch interagiert Podoplanin innerhalb des Zellzyklus durch Destabilisierung von Zell-Zell-Kontakten. Diese Zellmigration kann Podoplanin auch ohne eine EMT induzieren [141, 142].

Ein unabhängiger Weg der Tumor-Zell-Invasion kann ohne Cadherin Switch oder Unterbindung der EMT im Bereich des peritumorösen Gewebes erfolgen. Beide Varianten der Tumordinvasion, EMT und Non-EMT, können simultan in einem Tumorgeneseweg vorliegen [64].

#### **2.2.1.7 Submaxillary gland androgen regulated protein 3A (SMR3A)**

Das Submaxillary gland androgen regulated protein 3A (*SMR3A*) ist ein humanes Opiorphin, das durch posttranslationale Synthese aus Pentapeptiden entsteht [145].

Opiorphine regulieren Nozizeptoren, beeinflussen physiologische Prozesse inklusive der erektilen Funktion [133] und konnten als potente Inhibitoren der *Neutral-Endopeptidase* (NEP) nachgewiesen werden [145]. Diese werden an der Zelloberfläche exprimiert und wirken regulatorisch auf die Bindungsaffinität von Peptid-Agonisten und deren Rezeptoren, indem Proteolyse und Bindungslösung von membranständigen Rezeptoren katalysiert werden [85].

Durch Inhibition mittels Opiorphin-Homologa können maligne Entartungen und Tumorwachstum modifiziert werden, indem die Bindungszeit der Peptid-Agonisten an ihre Rezeptoren prolongiert wird [129].

In Prostata-, Pankreas-, Lungen- und Nierenzellkarzinomen korrelieren eine fehlende oder verminderte SMR3A-Expression invers mit maligner Progression und Metastasierung. Immunhistochemisch konnte SMR3A in 36% der Oropharynxkarzinome nachgewiesen werden. Bei hoher Expression konnte nachgewiesen werden, dass die klinischen Endpunkte *Progressionsfreies-* und *Gesamtüberleben* vermindert sind [56].

### **2.3 Zielsetzung der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit untersucht retrospektiv ein anonymisiertes Kollektiv 80 konsekutiv behandelter Patienten mit Erstdiagnose eines Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle. Die Untersuchungen erfolgten unter Betrachtung erkrankungsspezifischer Einflüsse in Verbindung mit histopathologischen Ergebnissen der Tumorsektate.

Patientenindividuelle Faktoren und deren prognostische Relevanz wurden in Bezug auf die klinischen Endpunkte *Gesamtüberleben* und *erkrankungsfreies Überleben* untersucht.

Bei allen Patienten bestand die Indikation zur primären Resektion in kurativer Absicht. Die weitere onkologische Therapie erfolgte postoperativ risikoadjustiert. Analog Tumorboardbeschluss wurde bei Vorliegen von Risikofaktoren eine adjuvante Therapie ergänzt. Diese erfolgte entweder als alleinige Radiotherapie oder kombinierte Radiochemotherapie mit Carboplatin. Histopathologische Beurteilungskriterien der vorliegenden Arbeit basieren auf der TNM-Klassifizierung nach der sechsten Version der Union International Contre le Cancer (*UICC*) [94]. Das Patientenkollektiv zeigte sich histologisch und therapeutisch heterogen. Eine Subpopulation konnte als HPV-Träger identifiziert werden.

Retrospektiv erfolgten statistische Auswertungen des immunhistochemischen Expressionsverhaltens der Proteinstrukturen *Podoplanin* und *SMR3A* innerhalb der Primärresektate. Ergänzend wurden quantitative Analysen von *EGFR*, *VEGF2*, *Moesin*, *PKM2* und *COX-2* durchgeführt und Einflüsse bezüglich der definierten klinischen Endpunkte untersucht, mit dem Ziel prognostisch relevante Biomarker für Mundhöhlenkarzinome zu detektieren.

Die vorliegende Arbeit ist keine randomisierte und prospektiv angelegte Untersuchung, sondern eine retrospektive Betrachtung, weshalb die Empirie der Daten eingeschränkt sein kann. Im Rahmen der operativen Behandlung könnten bei einzelnen Patienten Risikofaktoren detektiert worden sein, die eine primär chirurgische Intervention obsolet gemacht hätten. Dies stellt im Kontext multimodaler Behandlungen komplex erkrankter Tumorpatienten eine alltägliche Herausforderung interdisziplinärer Therapien dar und bietet einen interessanten Patientenquerschnitt sämtlicher Erkrankungsstadien, Stagingergebnisse und histologischer Varianten.

Es besteht ein stetiger Versuch klinische und pathologische Informationen, sowie statistische Untersuchungen sinnvoll zusammenzuführen, um individualisierte Therapiekonzepte ableiten zu können. Die Definition prognostisch verlässlicher Parameter könnte eine Risikostratifizierung für das Vorliegen unvorteilhafter klinischer Faktoren ermöglichen, um Risikogruppen für Therapieversagen frühzeitig zu erkennen [87].

Dabei sind die Untersuchungen molekularpathologischer, biochemischer, viraler und genmodulatorischer Tumorspezifikationen in Bezug auf Therapieeffektivität und Therapieversagen Gegenstand aktueller Forschungen.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Behandlungsablauf**

Der Behandlungszeitraum der Patienten lag zwischen Oktober 2002 und Juni 2005. Alle Patienten erhielten ihre chirurgisch-onkologische Primärtherapie in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik zu Köln. Vereinzelt wurden Behandlungsdetails und Überlebensdaten bereits im Vorfeld publiziert [63].

#### **3.2 Operation**

Alle Patienten erhielten eine kurativ intendierte Therapie. Die primäre Behandlung erfolgte als radikale Tumorsektion mit kombinierter bilateraler Neck-Dissection. Bei Patienten mit bildmorphologisch unauffälligem zervikalen Lymphknotenstatus im prä-operativen klinischen Staging (*cN0*), erhielten eine suprahyoidale Neck-Dissection der Lymphabflusslevel I-III. Patienten mit bildmorphologisch suspekter zervikaler Lymphknotenbeteiligung (*cN+*) oder histopathologischem Nachweis von Metastasen (*pN+*) in der Schnellschnittdiagnostik der suprahyoidalen Neck-Dissection wurde eine Erweiterung der Operation durch eine radikal-modifizierte Neck-Dissection der Lymphabflusslevel I-V durchgeführt.

#### **3.3 Adjuvante Behandlung: Radiotherapie und Radiochemotherapie**

Bei Nachweis eines UICC-Stadium I erfolgte die rein operative Therapie ohne Adjuvanz. Patienten der UICC-Stadien II-IVb erhielten analog der postoperativen Tumorboardbeschlussfassung risikoadjustiert eine adjuvante Behandlung mittels alleiniger Radiotherapie oder kombinierter simultaner Radiochemotherapie.

Die Bestrahlung wurde an fünf Tagen pro Woche durchgeführt und erfolgte maskenimmobilisiert als normofraktionierte 3D konformale Bestrahlung mit 6-15 MeV Photonen am Linearbeschleuniger mit 6-9 Feldern. Die Bestrahlung wurde auf die Tumorregion sowie die bilateralen zervikalen Lymphabflusswege mit 1,8 Gy Einzeldosis (*ED*) ad 50,4 Gy kumulierter Gesamtreferenzdosis (*GRD*) verordnet. Ein sequenzieller Boost erfolgte auf den Bereich der primären Tumorregion sowie der tumorbefallenen Lymphabflussgebiete mit 1,8 Gy ED ad 59,4 bis 66,6 Gy kumulierter GRD.

Bei individuellem Vorliegen von Risikokonstellationen oder Nachweis eines aktiven Tumorgeschehens im Rahmen der Radioonkologischen Evaluation erfolgte in vereinzelt Fällen eine weitere Dosisescalation, wobei die Dmax des Spinalkanals unter 50 Gy (*V50* < 1%) lag.

Die simultane Chemotherapie wurde monotherapeutisch mit Carboplatin AUC1 d1-5 und d29-33 konkomitant zu der Radiotherapie geplant. Die Chemotherapie wurde eine Stunde vor der täglichen Bestrahlung nach Prämedikation (Glukokortikoide, Antihistaminika und Antiemetika) über insgesamt 3 Stunden verabreicht.

Patienten, bei denen eine indizierte adjuvante Therapie abgelehnt wurde, wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen. Das Vorliegen von Fernmetastasen galt als Ausschlusskriterium für die Auswertung.

### **3.4 Datenerhebung**

Die spezifischen Patientendaten wurden nach Abschluss der Behandlungen in den chirurgischen und strahlentherapeutischen Tumornachsorgen sowie in einzelnen Fällen ergänzend über eine Abfrage der Einwohnermeldeämter erhoben. Staging Befunde wurden mittels klinischer und histopathologischer Ergebnisse auf Grundlage der Dokumentation der digitalen und analogen Patientenakten ausgewertet.

Die Nachsorgezeit wurde definiert als der Zeitraum beginnend ab Erstdiagnosezeitpunkt bis zum Zeitpunkt der letzten Konsultation oder dem Exitus.

Diese Daten wurden im Vorfeld durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Matthias Kreppel erhoben und zur weiteren Verwendung für mein Dissertationsprojekt anonymisiert unter Einschluss histopathologischer Ergebnisse zur Verfügung gestellt.

#### **3.4.1 Präparate Auswahl**

Die Untersuchungsgewebeproben wurden initial mit Hämatoxylin-Eosin (*HE*) gefärbt. Dies erfolgte zur Beurteilung der Präparate durch einen Facharzt für Pathologie, um repräsentative Gewebeareale zu identifizieren, in denen vitale Tumorzellen für die weiteren Arbeitsschritte nachweisbar waren. Es wurden zur Beurteilung der Podoplanin-Expression lediglich Gewebeblöcke untersucht, in denen mindestens 70% vitale Tumorzellen vorlagen.

#### **3.4.2 Immunhistochemische Färbungen**

Die immunhistochemischen Färbungen der Operationsresektate für SMR3A und Podoplanin erfolgten nach Herstellerangaben. Die verwendeten Untersuchungsmethoden und Protokolle konnten bereits bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx, der Mundhöhle und der äußeren Haut, sowie oralen Leukoplakien eingesetzt werden [61, 63, 104, 129, 148].

### **3.4.3 Immunhistochemie**

Als Gewebeproben wurden repräsentative Bereiche der peripheren Invasionsfront der Tumor-Operationspräparate verwendet, mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die histopathologischen Auswertungen erfolgten analog der Verfahren von Yuan et al. [148]. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 4 µm dicke Schichten angefertigt, auf Objektträger mit positiv geladener Oberfläche übertragen und zur besseren Anhaftung über Nacht bei 60°C in einem Wärmeinkubator dehydratisiert. Die Schnittpräparate wurden anschließend mit Xylol entparaffinisiert und in absteigender Alkoholkonzentrationsreihe rehydratisiert. Die Versuchsanordnung erfolgte triphasisch für je fünf Minuten in 100% Ethanol, 90% Ethanol und 70% Ethanol, bevor die Präparate mit destilliertem Wasser vollständig rehydratisiert wurden.

#### **3.4.3.1 Antigen-Demaskierung**

Die antigenen Epitope der Präparate mussten aufgrund der Formalinfixierung zur Vorbereitung der Antikörperbindung durch Hitze demaskiert werden. Dazu wurden die Präparatschnitte in thermostabile Plastikkuvetten mit Citratpuffer (10 mmol/L; pH 6,0; Dako Cytomation, Carpinteria, CA) gegeben, 20 Minuten erwärmt und anschließend für 45 Minuten gekühlt. Die Objektträger waren von Flüssigkeit umgeben, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern.

#### **3.4.3.2 Blockierung der Endogenen Peroxidase**

In Granulozyten, Erythrozyten und Mastzellen kommt das Enzym Peroxidase physiologisch vor. Um Ergebnisverfälschungen zu vermeiden, musste die endogene Peroxidase entsprechend der Protokolle von Kawaguchi und Yuan et al. blockiert werden [54, 148]. Anderenfalls hätten sich mit dem Substratpuffer, dem Katalysator H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und dem Chromogen 3,3' Diaminbenzidin-Tetrahydrochlorid (*DAB*) colorierte Stoffwechselprodukte ausgebildet, die nicht vom Reaktionsendprodukt per Avidin-Biotin-Enzym-Komplex-Methode (*ABC-Methode*) zu unterscheiden gewesen wären.

Diese Blockierung vor dem Färbungsprozess wurde über eine zehnminütige Inkubation der Schnittpräparate mit einer 3%-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und Methanol durchgeführt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Phosphate Buffered Saline (*PBS*) gewaschen. Vor der Versetzung der Präparate mit dem Primärantikörper wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen blockiert. Dies erfolgte durch Versetzung mit 10%-igem Normalserum-PBS für 30 Minuten und anschließendem Auswaschen mit PBS.

### **3.4.3.3 Immunhistochemische Färbung von Podoplanin**

Um die Expressionsintensität der Präparate zu untersuchen, wurde Podoplanin immunhistochemisch mittels ABC-Methode (*Vectastatin Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA*) quantifiziert.

Die in der dieser Arbeit verwendeten xenogenen Antikörper zur reaktionären Bindung an Podoplanin (*D2-40; Vector Laboratories, Burlingame, CA*) sind monoklonale Maus-Antikörper.

Die ABC-Methode nutzt eine Komplexbildung aus Avidin und biotinyliertem Enzym, wobei Avidin mit hoher Affinität an Biotin mit bis zu vier Molekülen binden kann.

Die Präparate werden mit dem unkonjugierten Primär-Antikörper aufgetragen, bevor in einem zweiten Schritt die Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-Antikörper erfolgt und anschließend das enzymatisch gebundene Avidin hinzugefügt wird. Über eine Peroxidasekatalysation wird das Substrat 3,3'-DAB oxidiert und dadurch farbig sichtbar, wobei der manuelle Färbeprozess bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer erfolgte. 100µl PBS pro 1% bovinem Serum-Albumin mit 1:100 verdünntem Primär-Antikörper werden für 30 Minuten mit den Präparaten inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS gespült und mittels equinem biotinyliertem Sekundär-Antikörper (*anti-Maus; 1:200*) über Nacht bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Es erfolgte erneut eine Spülung mit PBS vor der enzymatischen Nachweisreaktion mittels ABC-Komplex-Methode (*Vectastatin Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA*). Der ABC-Komplex wurde 30 Minuten vor Verwendung angesetzt und die Inkubation für 20 Minuten durchgeführt.

Chromogenes DAB (*A. Menarini diagnostics, Berlin*) wurde direkt vor der Verwendung für die Färbereaktion angesetzt. Nach Spülung der Präparate mittels PBS, erfolgte die Färbereaktion unter Sichtkontrolle. Eine Gegenfärbung wurde mit Mayers Hämalaun (*Dako Cytomation*) nach Spülung in destilliertem Wasser für 15 - 30 Sekunden durchgeführt.

Nach Abschluss der Färbereaktion über 10 Minuten erfolgte eine Dehydratisierung in aufsteigender Alkoholreihe und abschließende Eindeckung der Objektträger mittels Aquatex.

### **3.4.3.4 Negativ- und Positivkontrollen**

Zur Validierung der erhobenen Ergebnisse wurden parallel eine Positiv- und Negativkontrolle durchgeführt. Bei jeder Präparate Färbung musste eine Negativkontrolle angefertigt werden, um die Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung zu kontrollieren. Dazu wurde eine Negativ-Kontrolllösung anstelle des Primärantikörpers verwendet.

Aufgrund der physiologischen lymphatischen Dichte des Endothels innerhalb der untersuchten Mundschleimhaut, wurden interne Positivkontrollen durchgeführt. Diese dienten als Sensitivitätsnachweis des Antikörpers und zur Kontrolle einer korrekten Versuchsdurchführung.

### 3.4.3.5 Auswertung der Präparate

Für die Auswertung und Klassifizierung der Podoplanin-Expression der selektierten Gewebeblöcke wurde ein semiquantitativer Algorithmus basierend auf einer Skala von 0 (negativ) bis 3 (starke Färbung) verwendet. Dieser wurde im Vorfeld von der Arbeitsgruppe bereits publiziert [61, 62, 63].

Jedes Präparat wurde von zwei Untersuchern verblindet, unabhängig voneinander und ohne Kenntnis patientenspezifischer klinischer Informationen ausgewertet. Bei jedem Patienten wurde lediglich ein Objektträger zur Analyse verwendet. Im Rahmen der Auswertung wurde die Intensität der Färbung beurteilt und von 0 bis 3 skaliert, addiert und arithmetisch gemittelt.

Bei Kalkulation einer ungeraden Zahl wurde das Präparat der niedrigeren Gruppe zugeordnet: Ergab sich zum Beispiel ein Wert von 2,5 so wurde das Präparat zur Gruppe mit moderater Podoplanin-Expression (Grad 2) gezählt. Die folgende *Tabelle 1* zeigt eine Übersicht.

<b>Podoplanin Expressionsgrade</b>	
0	kein Nachweis einer Podoplanin-Expression
1	schwache Podoplanin-Expression
2	moderate Podoplanin-Expression
3	starke Podoplanin-Expression

*Tabelle 1: Einteilung der Podoplanin Expressionsgrade*



### **3.4.4 SMR3A**

#### **3.4.4.1 SMR3A Immunhistochemie**

Die Vorbereitung und Anfertigung der histopathologischen Präparate zur Anfärbung für SMR3A erfolgte analog der oben genannten Verfahrensweise für Podoplanin mittels Paraffinisierung und Aufbereitung in 2 µm dicke Schnitte.

#### **3.4.4.2 Anfertigung der Schnittpräparate**

Zur Detektion repräsentativer Areale zur Untersuchung einer SMR3A-Expression, wurden die Präparate nach Durchführung einer HE-Färbung auf das Vorhandensein maligner Kriterien untersucht. Präparate von 40% - 90% Tumorzellnachweis wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt.

Das Gewebe wurde kryokonserviert und mittels Gewebe Chip Microarrayer (*Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA*) in Präparate von 0,6mm Dicke je Probe geschnitten. Diesen wurde ein Lysat Puffer (*6 M Guanidin-HCl, 100 mM Natrium-Phosphate mit pH 6.6 und 1% Triton X-100*) für eine 100mg Gewebe/ml Lysat Konzentration für 60 Minuten bei Raumtemperatur und unter konstantem Schütteln beigefügt. Dem Lysat wurde ein Protease Inhibitor Mix (*Sigma*) mit Peptin Aprotinin von 6,512 kDa Molekulargewicht beigefügt.

#### **3.4.4.3 Antigen-Demaskierung**

Die Antigen Demaskierung erfolgte über 30 Minuten bei Hitze mit 10 mM Citrat-Puffer (*pH 6.0, Multi Gourmet Steamer, Braun, Germany*).

Die immunhistochemischen Färbungen wurden analog der Protokolle von Thierauf et al. [129] mittels anti-humanem SMR3A Antikörper (*ab97942, Verdünnung 1:50; Abcam, Cambridge, UK*) durch Verwendung des TSA Amplification Kit's (*Perkin Elmer, Germany*) durchgeführt.

#### **3.4.4.4 Negativ- und Positivkontrollen**

Die Spezifität der Bindung wurde durch parallele immunhistochemische Färbung weiterer Tumorbereiche mit anderen unabhängigen anti-human SMR3A Antikörpern (*ab97942, abcam, Cambridge, UK*) kontrolliert, die eine vergleichbare Intensität und Färbemuster zeigen. Diese Daten werden im Folgenden nicht weiter betrachtet. Als Positivkontrolle wurde Speicheldrüsengewebe genutzt. Als Negativkontrolle diente tumorfreies Normalgewebe.

#### **3.4.4.5 Auswertung der Präparate**

Die Gewebeproben wurden mit dem Nanozoomer HAT Scan System (*Hamamatsu Phototonics, Japan*) digitalisiert, um eine großflächige histologische Auswertung des Gesamtpräparates zu ermöglichen.

Die Schnitte wurden bei 40-facher Vergrößerung (0,23 µm/Pixel) gescannt und besitzen eine durchschnittliche Dateigröße von 13GB. Drei unabhängige, erfahrene Untersucher analysierten die gescannten Schnitte mittels NDP Viewer Software (Version 1.1.27).

Die Auswertung und Skalierung der SMR3A-Expression erfolgten als semi-quantitative Analyse unter Beachtung zweier unabhängiger Kriterien und wurden analog den Auswertungen von Koffler et al. [47] bewertet.

- 1) Die Anzahl der gefärbten Tumorzellen (*Score A*) von 1 bis 4.  
Hierzu wurde die Anzahl der gefärbten Zellen definiert als „1 = keine positiven Zellen“, „2 < als 33%“, „3 = 34-66%“ und „4 > 66%“ positiver Zellen im Gewebe nachweisbar.
- 2) Die Färbeintensität der gefärbten Tumor Zellen (*Score B*) von 1 bis 4.  
Hierzu wurde die Anzahl der gefärbten Zellen definiert als „1 = keine Anfärbung“, „2 = schwache Anfärbung“, „3 = moderate Anfärbung“ und „4 = intensive Anfärbung“ der Zellen im Gewebe.

Die Ergebnisse der Klassifizierung für Score A und Score B wurden unabhängig durch einen zertifizierten Facharzt für Pathologie bestätigt. Diesem lagen keine Informationen zu den Präparaten und keine klinischen Informationen vor.

Zusätzlich wurden beide Scores zu dem „Finalen Expressions Score“ (1 bis 16) miteinander multipliziert und graduell eingeteilt in eine Gruppe mit hoher SMR3A-Expression (Score = 9–16), moderater SMR3A-Expression (Score = 5–8), geringer SMR3A-Expression (Score = 1–4) oder fehlender SMR3A-Expression. Das Vorliegen einer Expression durch das Vorliegen einer mindestens 10%-igen Positivität der Tumorzellen mit einer Mindestintensität von 1 definiert.

Proben, bei denen diese Vorgaben unterschritten wurden, wurden als negativ klassifiziert.

#### **3.4.5 Humanes Papillomavirus (HPV) und p16 Immunhistochemische Färbung**

Für den Nachweis einer HPV-Assoziation der Präparate wurde eine Beurteilung der Expression von p16 verwendet [100, 144].

Die Resektate wurden in p16-positive und p16-negative Tumoren unterteilt, wobei die Positivität einer diffusen zytoplasmatischen und nukleären Expression entsprach.

Die Immunhistochemische Färbung gegen p16 konnte an durch Formalin fixierten Proben von 59 Primärpräparaten durchgeführt werden und lag der vorliegenden Arbeit als Information zu den Patienten vor.

### **3.5 Statistische Auswertung**

Die erhobenen Daten wurden am Computer mit Hilfe des Statistical Package for Social Sciences (SPSS, IBM) Version 26 für das Windows Operating System analysiert.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Daten wurden in der Nachsorge in 4-6 Monatsintervallen in der Universitätsklinik zu Köln erhoben.

Die Korrelation einer Podoplanin-Expression mit klinisch-pathologischen Variablen konnte für kontinuierlich verteilte Variablen mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Test sowie für kategoriale Variablen mit dem  $\chi^2$ -Test statistisch ausgewertet werden. Im Falle einer erwarteten Häufigkeit von unter 5 wurde anstelle des  $\chi^2$ -Tests der Fisher's-Exact Test verwendet.

Kumulierte Überlebensraten wurden mit Hilfe des Kaplan-Meier-Tests für das Gesamtüberleben und das erkrankungsfreie Überleben erhoben.

Hierbei wurde das Gesamtüberleben als der unkorrigierte Zeitraum definiert, der ab Beginn der Primärtherapie bis zum Tod, unabhängig der Todesursache und dargestellt in Monaten, gemessen wurde. Patienten, die bis zum Abschluss des definierten Beobachtungsintervalls nicht verstorben waren oder anhand der vorliegenden Daten unklar ist, ob sie verstorben waren, wurden zensiert.

Als erkrankungsfreies Überleben galt der Zeitraum ab Beginn der Primärbehandlung bis zum Progress, Rezidiv, Metastasierung oder tumorassoziertem Tod.

Interkurrent tumorfrei verstorbene Probanden wurden zum Todeszeitpunkt zensiert.

Um unterschiedliche statistisch prognostisch relevante Faktoren auf das Gesamtüberleben und das erkrankungsfreie Überleben zu detektieren, wurden univariate Analysen mittels Log-Rank-Test durchgeführt, bei dem ein p-Wert von  $\leq 0.05$  als statistisch signifikant definiert wurde.

Die mittels univariater Analyse prognostisch als statistisch signifikant ermittelten Faktoren für das Überleben wurden in einer multivariaten Analyse untersucht. Hierzu wurde eine zweistellige Signifikanzrechnung als Regressionsanalyse mittels Cox-Hazard Test durchgeführt und ein p-Wert von  $\leq 0.05$  als statistisch signifikant definiert.

Die statistischen Analysen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. Matthias P. Kreppel und in Rücksprache mit dem Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSIE).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Deskriptive Statistik

#### 4.1.1 Alter, Geschlecht und Tumorlokalisation

Im untersuchten Kollektiv befinden sich insgesamt 80 Patienten, von denen 51 (63,7 %) männlich und 29 (36,3 %) weiblich sind. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren die Patienten zwischen 30 und 91 Jahre alt und zeigten ein mittleres Alter von 61,6 Jahren und ein medianes Alter von 61,8 Jahren. Männer waren im Durchschnitt 59,5 Jahre alt (Median 60,0 Jahre), während Frauen mit 65,2 Jahre durchschnittlich älter waren (Median 65,0 Jahre). Die Altersverteilung wurde in sechs Gruppen vorgenommen und ist *Tabelle 2* zu entnehmen.

Alter (in Jahren)	< 40	41 - 50	51 – 60	61 – 70	71 – 80	> 80
Anzahl (Prozent)	4 (5,0%)	9 (11,3%)	24 (30,0%)	23 (28,7%)	14 (17,5%)	6 (7,5%)

*Tabelle 2: Altersverteilung Gesamtkollektiv*

Bei allen Patienten lagen als Einschlusskriterium lokal begrenzte und lokal fortgeschrittene orale Plattenepithelkarzinome ohne Fernmetastasierung vor. Hier zeigen sich mit 43,8% als häufigste Lokalisation Tumoren des Mundbodens, gefolgt von der Zunge (22,5%), Unterkiefer (17,5%), Oberkiefer/Harter Gaumen (6,3 %) und Wange (10,0%). Die Lokalisation des Primärtumors kann *Tabelle 3* entnommen werden.

Lokalisation des Primarius	Mundboden	Zunge	Unterkiefer	Oberkiefer/harter Gaumen	Wange
Anzahl (Prozent)	35 (43,8%)	18 (22,5%)	14 (17,5%)	5 (6,3%)	8 (10,0%)

*Tabelle 3: Tumorlokalisation des Primarius*

#### 4.1.2 Alkohol, Rauchen und HPV

Bei allen Patienten konnte das Konsumverhalten der Genussmittel Alkohol und Nikotin untersucht werden. Hierbei lässt sich für die Exposition gegenüber Alkohol ( $p=0.662$ ) und Rauchen ( $p=0.509$ ) kein geschlechtsspezifischer Unterschied feststellen. Von den Patienten zeigten 53 (66,3%) vor Erstdiagnosestellung einen gesteigerten Alkoholkonsum und 63 Patienten (78,8%) eine positive Raucheranamnese. Insgesamt 35 (68,6%) der männlichen und 18 (62,1%) der weiblichen Patienten sind durch Alkoholkonsum, sowie 76,5% bzw. 82,8% durch eine positive Raucheranamnese vorbelastet.

Der HPV-Status des Primärtumors konnte bei insgesamt 59 Resektionspräparaten untersucht werden, wobei der Großteil mit 34 Präparaten (57,6%) HPV-negativ war und 25 Präparate (42,4%) HPV-positiv waren. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern ( **$p=0.038$** ). Bei männlichen Patienten zeigen 51,2% einen positiven HPV-Status, während dieser lediglich bei 22,2% der Frauen vorliegt.

Auch eine Korrelation zwischen HPV-Status und Alkohol- sowie Nikotinkonsum wurde durchgeführt. Bei Patienten ohne Alkoholkonsum zeigt sich in der überwiegenden Anzahl mit 56,6% ein HPV-negativer Status ( $p=0.891$ ). Bei Patienten ohne Nikotinabusus liegt in 30,7% ein negativer HPV-Status vor, während 65,2% der Patienten mit Nikotinabusus einen negativen HPV-Status zeigen ( **$p=0.026$** ). Diese Gruppe HPV-negativer Raucher macht mit absolut 50,8% des Kollektivs den größten Teil aus.

Im Hinblick auf das Alter zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des HPV-Status ( $p=0.245$ ). Patienten der oberen Altersmediangruppe zeigen zu 51,4% einen HPV-negativen Status, während 66,7% der jüngeren Gruppe HPV-negativ sind.

Insgesamt sind somit 66,3% der Patienten durch Alkoholismus, 78,8% durch Rauchen und 42,4% durch HPV vorbelastet.

Im Chi-Square Test zeigt sich eine Assoziation zwischen dem Vorliegen eines positiven HPV-Status und des männlichen Geschlechts ( **$p=0.038$** ) sowie des Raucherstatus' ( **$p=0.026$** ). Für Podoplanin ( $p=0.806$ ) und SMR3A ( $p=1.000$ ) zeigt sich statistisch keine Assoziation zum HPV-Status. Weiterhin kann keine Assoziation zum Vorliegen einer Lymphangiosis ( $p=0.646$ ), Nodalstatus-und-ENE ( $p=0.201$ ), dem T-Stadium ( $p=0.660$ ) und UICC-Stadium ( $p=0.540$ ) festgestellt werden.

### 4.1.3 Histologischer Grad der Differenzierung, TNM-Klassifikation und UICC-Stadien

#### 4.1.3.1 UICC-Stadien

Aus dem Kollektiv der primär kurativ intendiert operativ behandelten Patienten konnten insgesamt 46 Patienten (46,3%) dem UICC Stadium I und II (23 und 13), sowie 44 Patienten (53,8%) dem Stadium III und IV (8 und 36) zugeteilt werden. Hierbei wird ein geschlechtsabhängiger Unterschied innerhalb der UICC-Graduierung knapp verfehlt ( $p=0.076$ ). Eine übersichtliche Darstellung zeigt *Tabelle 4*.

UICC-Stadium	I	II	III	IVa	IVb
Anzahl Gesamt (Prozent)	23 (28,7%)	13 (16,3%)	8 (10,0%)	28 (35,0%)	8 (10,0%)

*Tabelle 4: UICC-Stadien des Gesamtkollektives analog der 6. Auflage*

#### 4.1.3.2 Histologischer Grad der Differenzierung (Grading)

Der häufigste histopathologische Grad der Zelldifferenzierung (*Grading*) des untersuchten Kollektivs zeigte bei 62 Patienten (77,5%) ein mäßig differenziertes (*G2*) Plattenepithelkarzinom. Ein gut differenziertes Stadium (*G1*) lag bei lediglich fünf Patienten (6,3%) und ein schlecht differenziertes (*G3*) Karzinom bei 13 Patienten (16,3%) vor. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied ist nicht nachweisbar ( $p=0.391$ ).

#### 4.1.3.3 Tumorstadium (T)

Bei 24 Patienten (30,0%) wurde histopathologisch ein Stadium *pT1*, bei 27 (33,8%) ein *pT2*, bei sechs (7,5%) ein *pT3* und bei 23 (28,7%) ein *pT4* Stadium nachgewiesen. Hiervon wurden 15 Patienten dem Stadium *pT4a* (18,8%) und acht Patienten dem Stadium *pT4b* (10,0%) zugeordnet.

Bezüglich des T-Stadiums zeigte sich kein signifikanter Geschlechtsunterschied ( $p=0.714$ ) in den einzelnen Stadien und auch nicht innerhalb des Gruppenvergleiches „I und II“ mit „III und IV“ ( $p=0.338$ ).

#### 4.1.3.4 Nodalstatus (N)

Im Rahmen der selektiven und therapeutischen Neck-Dissection wurden durchschnittlich 21,55 Lymphknoten [SD 14.964; Median 18.50] entfernt.

Bei 49 Patienten (61,3%) zeigte sich histopathologisch kein Hinweis auf eine Lymphknotenmetastasierung ( $pN0$ ). Bei neun Patienten zeigten sich Lymphknotenmetastasen im Stadium  $pN1$  (11,3%) und bei 22 Patienten im Stadium  $pN2$  (27,5%). Im Gesamtkollektiv weisen somit insgesamt 31 Patienten (38,7%) eine lymphogene Metastasierung auf. Bei Frauen lässt sich ein signifikant selteneres Auftreten von Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu Männern erkennen ( $p=0.017$ ).

#### 4.1.3.5 Extranodale Extension (ENE)

Extranodale Extension (ENE) von Lymphknotenmetastasen zeigte sich in 13 Fällen der 31 lymphonodulär metastasierten Patienten (41,9%).

Dabei zeigt das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen, sowie deren Unterscheidung nach extranodaler Extension die stärkste Assoziation mit Podoplanin ( $p<0.001$ ). Weiterhin zeigt sich der positive ENE-Status mit hoher Moesinexpression ( $p=0.002$ ), hohem UICC-Stadium ( $p<0.001$ ), hohem T-Stadium ( $p<0.001$ ), tumorassoziertem Tod ( $p=0.005$ ) sowie hoch signifikant mit Durchführung einer adjuvanten Behandlung assoziiert ( $p<0.001$ ). HPV ( $p=0.201$ ) und SMR3A ( $p=0.511$ ) zeigen keine Assoziation zur Einleitung einer Adjuvanz.

#### 4.1.3.6 Lymphangiosis (L)

Das Vorliegen einer Lymphangiosis konnte mit 15,0% bei 12 Patienten nachgewiesen werden. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den Geschlechtern ( $p=0.194$ ).

#### 4.1.3.7 Resektionsstatus

Insgesamt konnte die operative Behandlung in 65 Fällen (81,2%) ohne Tumorresiduum als R0-Resektion erfolgen.

Eine R1-Resektion zeigte sich in der histologischen Aufarbeitung bei 15 (18,8%) der Patienten, wobei neun Patienten männlich und sechs Patienten weiblich waren.

Ein geschlechtsspezifischer Unterschied bezüglich des Resektionsstatus konnte nicht festgestellt werden ( $p=0.771$ ).

Eine Übersicht über die assoziierten histopathologischen Befunde ist *Tabelle 5* zu entnehmen.

Befund	Männlich (n=51)	Weiblich (n=29)	SMR3A Kollektiv (n=28)	Gesamtkollektiv (n=80)
pT1	15	9	6	24
pT2	15	12	12	27
pT3	5	1	2	6
pT4	16	7	8	23
pN0	26	23	17	49
pN+	25	6	11	31
ENE	10	3	5	13
cM0	51	29	28	80
L0	41	27	26	68
L1	10	2	4	12
G1	2	3	2	5
G2	39	23	21	62
G3	10	3	5	13
R0	42	23	23	65
R1	9	6	5	15

Tabelle 5: Histopathologische Befunde des Gesamt- und SMR3A Subkollektivs

## 4.2 Therapie

Bei allen Patienten dieser Untersuchung erfolgte eine primär kurativ intendierte operative Behandlung, bei fehlendem Nachweis von distanten Metastasen im Rahmen des klinischen Erstdiagnosestagings (*cM0*). Alle Patienten erhielten eine primäre radikal operative Behandlung mit kombinierter bilateraler Neck-Dissection. Patienten mit bildmorphologisch negativer zervikaler Lymphknotenbeurteilung (*cN0*) analog des prä-operativen Stagings, erhielten eine suprahyoidale Neck-Dissection der Lymphabflusslevel I-III.

Bei Patienten mit bildmorphologisch positiver zervikaler Lymphknotenbeurteilung (*cN+*) oder Nachweis von (Mikro-)Metastasen (*pN+*) in der histopathologischen Schnellschnittdiagnostik der suprahyoidalen Neck-Dissection wurde eine radikal-modifizierte Neck-Dissection der Lymphabflusslevel I-V komplettiert. Im Falle von postoperativ vorliegenden Risikokonstellationen wurde individuell eine sequenzielle risikoadaptierte adjuvante Radioonkologische Therapie nach Tumorboardbeschlussfassung durchgeführt.

### 4.2.1 Adjuvante Therapie

Nach Radioonkologischer Indikationsstellung erfolgte eine adjuvante Behandlung als alleinige Radiotherapie in 25 Fällen sowie eine simultane Radiochemotherapie in weiteren 23 Fällen. Bei zwei Patienten lag keine Dokumentation über den adjuvanten Behandlungsstatus vor. Bei zwei Patienten wurde eine empfohlene Adjuvanz aufgrund einer Ablehnung durch den Patienten nicht durchgeführt. Ein Patient lehnte die indizierte simultane Chemotherapie ab. In acht Fällen lag keine Dokumentation über die radiotherapeutische Dosierung vor.



Im Falle einer simultanen Radiochemotherapie erfolgte diese monotherapeutisch mit Carboplatin AUC1 an d1-5 und d29-33 der Radiotherapie und konnte bei allen Patienten mit Behandlungsbeginn (n = 23) vollständig und ohne Unterbrechungen erfolgen.

Eine Übersicht der Therapieformen zeigt *Tabelle 6*.

Adjuvanztyp	Keine Adjuvanz	Radiatio	Radiochemotherapie
(n=78)	30 (38,5%)	25 (32,0%)	23 (29,5%)

*Tabelle 6: Übersicht Adjuvante Therapie*

Postoperativ erfolgte eine adjuvante Therapie bei 48 (60,0%) der Patienten, wobei 31 männlich (64,5%) und 17 (35,7%) weiblich waren. Innerhalb der Geschlechtergruppen erhielten 60,8% der männlichen Patienten und 58,6% der weiblichen Patienten eine adjuvante Therapie ( $p=1.000$ ).

Der Resektionsrandstatus zeigte sich knapp nicht signifikant ( $p=0.081$ ) mit der Einleitung einer adjuvanten Therapie assoziiert. Bei Vorliegen einer R0-Resektion erhielten 44,6% der Patienten keine adjuvante Therapie, wohingegen bei 36 Patienten (55,4%) mit R0-Status und zwölf Patienten mit R1-Status eine Nachbehandlung erfolgte. Bei drei Patienten mit vorliegendem R1-Status wurde keine adjuvante Behandlung durchgeführt. Der Resektionsrand zeigte eine Korrelation mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen ( $p=0.050$ ), ohne mit extrakapsulärer Extension ( $p=0.165$ ) und dem UICC-Stadium ( $p=0.057$ ) assoziiert zu sein.

Während sich keine Assoziation bezüglich des Geschlechts ( $p=0.741$ ) und HPV-Status ( $p=0.269$ ) zeigte, war die Entwicklung eines Lokalrezidivs hochsignifikant mit dem R-Status ( $p<0.001$ ) assoziiert. Weiterhin zeigte sich innerhalb des Kollektivs eine signifikante Assoziation zum Grading ( $p=0.047$ ). Die Bestrahlungsdosis ( $p=0.191$ ), Tod ( $p=0.130$ ), Podoplanin-Expression ( $p=0.107$ ) sowie die SMR3A-Expression ( $p=0.607$ ) zeigten keine Assoziation zum Resektionsrandstatus. Allerdings konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen Resektionsrand und PKM2-Expression ( $p=0.007$ ) gezeigt werden.

Die Einleitung einer adjuvanten Therapie war hochsignifikant mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen assoziiert ( $p=0.000$ ) und erfolgte bei 87,1% der Nodal-positiven Patienten. Demgegenüber erfolgte nur bei 42,9% der Nodal-negativen Patienten eine Adjuvanz. Bei Vorliegen eines Kapseldurchbruchs erhielten 92,3% der Patienten eine adjuvante Behandlung, während nur 53,7% der Patienten ohne Kapseldurchbruch eine adjuvante Behandlung erhielten ( $p=0.012$ ).

Auch der Lymphangiosisstatus war signifikant mit der Einleitung einer adjuvanten Therapie assoziiert ( $p=0.023$ ). In dem Kollektiv erfolgte bei vorliegendem L1-Status in 91,7% der Fälle (11 Patienten) eine adjuvante Therapie.

#### 4.2.1.1 Radiotherapiedosis

Die Dosis der Radiotherapie erfolgte risikostratifiziert zwischen 50,4 Gy Gesamtreferenzdosis und 59,4 bis 69,6 Gy Gesamtreferenzdosis. 50,4 Gy erfolgten auf die primäre Tumorregion inklusive des beidseitigen zervikalen Lymphabflussgebietes. Im Falle eines sequenziellen Boosts wurde eine Dosisescalation auf die primäre Resektionshöhle, Tumorhochrisikoregionen und Lymphknotenstationen mit extrakapsulärer Komponente eingeleitet. Die Radiotherapie wurde als bildgeführte drei-dimensionale, computertomographisch geplante, maskenimmobilisierte Hochvolttherapie am Linearbeschleuniger durchgeführt. Hierfür wurde eine Behandlung mit 6 MV Photonen an fünf Tagen pro Woche mit einer täglichen Einzelfraktionierungsdosis von 1,8 Gy appliziert. Hierbei erhielten 65,0% der Patienten (n=26) eine kumulierte Gesamtreferenzdosis von 59,4 Gy. 17,5 % erhielten eine Dosis von weniger als 59,4 Gy und 17,5% eine Dosis von mehr als 59,4 Gy.

Die Patientenverteilung nach Radiotherapiedosis ist *Tabelle 7* zu entnehmen.

Gesamtdosis der Radiotherapie	50,4 – 59,4 Gy	59,4 Gy	59,4 – 69,6 Gy
n=40	7 (17,5%)	26 (65,0%)	7 (17,5%)

*Tabelle 7: Übersicht Radiotherapiedosierung*

#### 4.2.2 Podoplanin

Die Podoplanin-Expression konnte im Chi-Square Test keine Assoziation in Bezug auf den HPV-Status ( $p=0.806$ ) nachweisen. Allerdings zeigte sich eine hochsignifikante Assoziation zum Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und deren Unterscheidung nach extranodaler Extension ( $p<0.001$ ), UICC-Stadium ( $p<0.001$ ), tumorassoziiertem Tod ( $p<0.001$ ) und Tod ( $p<0.001$ ). Zusätzlich wurde bezüglich des erkrankungsfreien Überlebens wurde eine hochsignifikante Assoziation ( $p=0.007$ ) notiert. Die Einleitung einer Adjuvanten Therapie ( $p=0.001$ ) korrelierte hochsignifikant mit dem Podoplanin-Status. Während die Podoplanin-Expression keine Assoziation in Bezug auf den HPV-Status ( $p=0.806$ ) zeigte, wurde eine Assoziation zu SMR3A ( $p=0.062$ ) knapp verfehlt und korrelierte hochsignifikant mit der Moesin-Expression ( $p=0.004$ ).

#### 4.2.3 Subgruppe mit Untersuchung einer SMR3A- Expression

Im Folgenden wird eine Subgruppen Betrachtung von 28 Patienten beschrieben, bei denen eine SMR3A-Expression des Primärtumors analysiert wurde.

Die SMR3A-Expression zeigte im Chi-Square Test keine geschlechtsspezifischen Unterschiede ( $p=1.000$ ). Des Weiteren konnte keine Assoziation bezüglich des Raucherstatus ( $p=0.308$ ), der Alkoholanamnese ( $p=0.708$ ) und der histopathologischen Kriterien T-Stadium ( $p=0,379$ ), UICC-Stadium ( $p=0.379$ ), Lymphangiosis ( $p=0.507$ ) und Nodal-und-ENE-Status ( $p=0.511$ ) festgestellt werden. Allerdings korrelierten Tod ( $p<0.001$ ) und tumorassoziierter Tod ( $p=0.005$ ) hochsignifikant mit der SMR3A-Expression. Für die Podoplanin-Expression ( $p=0.062$ ) und das erkrankungsfreie Überleben ( $p=0.102$ ) wurde knapp das 5%-Signifikanzniveau verfehlt.

Neben SMR3A ( $n=28$ ) erfolgten die zusätzlichen Untersuchungen für das Expressionsverhalten der Biomarker Moesin ( $n=27$ ), PKM2 ( $n=27$ ), EGFR ( $n=28$ ), VEGF2 ( $n=28$ ), COX2 ( $n=28$ ) und Podoplanin ( $n=28$ ).

Tabelle 8 gibt eine Übersicht über das jeweilige Expressionsverhalten stratifiziert nach Gruppen *Negativ, Schwach, Moderat und Stark*.

Oberflächenmarker	Negativ	Schwach	Moderat	Stark
Moesin (n=27)	1 (3,7%)	7 (25,9%)	9 (33,3%)	10 (37,1%)
PKM2 (n=27)	2 (7,4%)	10 (37,1%)	11 (40,7%)	4 (14,8%)
EGFR (n=28)	9 (32,1%)	7 (25,0%)	5 (17,9%)	7 (25,0%)
VEGF2 (n=28)	2 (7,1%)	12 (42,9%)	12 (42,9%)	2 (7,1%)
COX2 (n=28)	3 (10,7%)	10 (35,7%)	13 (46,5%)	2 (7,1%)
<b>Podoplanin</b> (n=28)	3 (10,7%)	8 (28,5%)	12 (42,9%)	5 (17,9%)
<b>SMR3A</b> (n=28)	7 (25,0%)	9 (32,1%)	5 (17,9%)	7 (25,0%)

Tabelle 8: Expressionsverhalten von Tumormarkern im SMR3A Kollektiv

##### 4.2.3.1 Alter, Geschlecht und Tumorlokalisierung

Die Präparate stammen von 14 männlichen und 14 weiblichen Patienten mit einem mittleren Alter von 60,4 Jahren. Die Lokalisationen der Primärtumoren befanden sich bei elf Patienten in der Zunge (39,8%), bei zehn Patienten (35,7%) im Mundboden, bei drei Patienten (10,7%) jeweils im Unterkiefer, sowie im Oberkiefer/Harter Gaumen und bei einem Patienten in der Wange (3,6%).

#### **4.2.3.2 Alkohol, Rauchen und HPV**

Ätiologisch konnte bei 16 Patienten (57,1%) ein gesteigerter Alkoholkonsum und bei 20 Patienten (71,4%) ein Nikotinkonsum nachgewiesen werden. Der HPV-Status konnte zusätzlich bei 20 Patienten (71,4%) bestimmt werden und war bei neun Patienten (45,0%) positiv, sowie bei elf Patienten (55,0%) negativ.

#### **4.2.3.3 Histologische Differenzierung, TNM-Klassifikation und UICC-Stadien**

21 Präparate wurden dem *G2 Stadium mäßig differenziert* zugeordnet (75%), während zwei *G1 gut differenziert* (7,1%) und fünf *G3 schlecht differenziert* (17,9%) beurteilt wurden.

##### **4.2.3.3.1 Nodalstatus**

In der histologischen Aufarbeitung der 28 Patienten konnte in elf Fällen (39,8%) ein nodaler Befall festgestellt werden, wobei fünf Patienten ein extrakapsuläres Wachstum aufwiesen. Dies entspricht 45,5% der Gruppe nodal positiver Patienten. Bei vier dieser elf nodal metastasierten Patienten lag ein *pN1* Status und bei sieben Patienten ein *pN2* Status vor.

Im Rahmen der Neck-Dissection wurden durchschnittlich 26,4 Lymphknoten reseziert (SD=16,9).

##### **4.2.3.3.2 Lymphangiosis**

Eine Lymphangiosis konnte bei vier der 28 Patienten (14,3%) nachgewiesen werden.

##### **4.2.3.3.3 Resektionsstatus**

Mit 82,1% erfolgte der Großteil der Resektionen ohne Tumorresiduum (*R0*; n=23), während in fünf Fällen (17,9%) postoperativ ein *R1*-Status vorlag.

##### **4.2.3.3.4 UICC-Stadien**

Im Kollektiv der SMR3A Subgruppe zeigte sich insgesamt in 46,4% der Fälle ein UICC-Stadium IV und insgesamt in 60,7% ein Stadium größer als III. Diese werden als fortgeschrittene Tumoren bezeichnet.

Tabelle 9 zeigt eine Übersicht über die UICC-Stadieneinteilung des SMR3A Kollektivs.

UICC-Stadium	I	II	III	IVa	IVb
Anzahl Gesamt (Prozent)	6 (21,4%)	5 (17,9%)	4 (14,3%)	10 (35,7%)	3 (10,7%)

Tabelle 9: UICC-Stadien des SMR3A Kollektivs (6. Edition)

#### 4.2.3.3.5 Folgeerkrankung und Tod

Bei lediglich sechs Patienten (21,4%) konnte im Rahmen der Nachsorgebeobachtungen ein Rezidiv festgestellt werden, wobei dieses in 66,6% als Lokalrezidiv auftrat. Ein Zweitkarzinom konnte bei einem Patienten und eine Fernmetastasierung im Krankheitsverlauf bei fünf Patienten (17,9%) beobachtet werden. Die klinischen Endpunkte *Rezidiv*, *Tod* und *Zweitkarzinom* wurden bei zehn Patienten beobachtet. Bei neun Patienten kam es im Nachbeobachtungszeitraum zum Exitus. Dabei waren 77,8% der Todesfälle tumorassoziiert.

#### 4.2.3.4 Adjuvante Therapie

Aus dem hier beschriebenen Kollektiv mit Untersuchung einer SMR3A-Expression erhielten 20 der 28 Patienten eine adjuvante Therapie (71,4%).

### 4.3 Gesamtüberleben

Aufgrund der geringen Patientenzahl innerhalb der SMR3A Subgruppe, wurde die weitere Betrachtung der statistischen Einflüsse auf das patientenspezifische *Gesamtüberleben* im Folgenden als Auswertung des Gesamtkollektives durchgeführt.

#### 4.3.1 Geschlecht

In der Untersuchung ließ sich für das Gesamtüberleben statistisch kein Unterschied bezüglich des Geschlechtes beobachten ( $p=1.000$ ). Insgesamt verstarben 37,2% der Männer und 34,5% der Frauen innerhalb der Beobachtungszeit, wobei das Überleben bei männlichen Patienten durchschnittlich 53,5 Monate [KI: 45,3 – 61,6] und bei Frauen durchschnittlich 50,3 Monate [KI: 41,7 – 59,0] betrug. Zwar zeigten Männer ein geringfügig kürzeres 2-Jahres und 5-Jahres Überleben (76,5% und 63,1%) als Frauen (81,7% und 67,4%), allerdings war dieser Unterschied im Log-Rank Test statistisch nicht signifikant ( $p= 0.937$ ). [Siehe Abbildung 1].

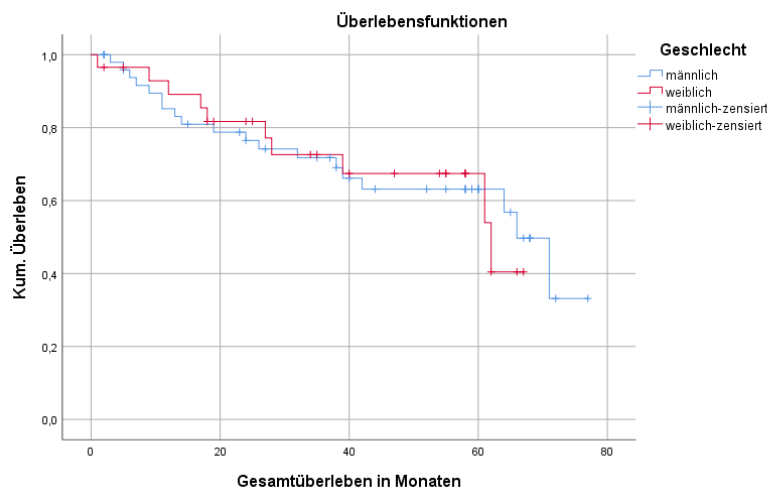


Abbildung 1: Gesamtüberleben getrennt nach Geschlecht

#### 4.3.2 Alter

Die Kohorte konnte anhand des Altersmedian von 61,8 Jahren in zwei Gruppen unterteilt werden. Jüngere Patienten lebten mit durchschnittlich 60,5 Monaten [KI: 52,0 – 68,8] länger als ältere Patienten mit 46,6 Monaten [KI: 37,9 – 55,2] und verstarben mit absolut 26,3% gegenüber 45,2% seltener ( $p=0.104$ ).

Obwohl die Patienten des jüngeren Medians eine höhere 2-Jahres-Überlebensrate von 86,2% gegenüber Patienten des älteren Medians mit nur 70,9%, sowie eine 5-Jahres-Überlebensrate von 80,1% gegenüber 50,9% aufwiesen, verfehlte dieser Unterschied im Log-Rank Test statistisch knapp das Signifikanzniveau ( $p=0.082$ ). [Siehe Abbildung 2].

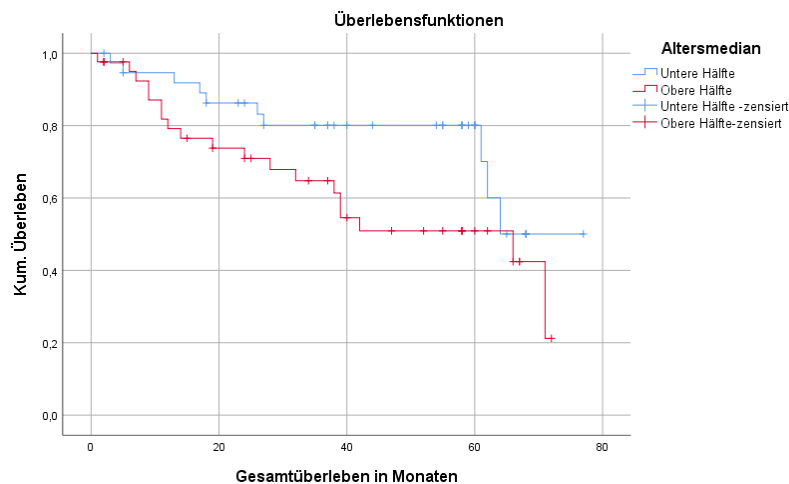


Abbildung 2: Gesamtüberleben getrennt nach Patientenalter

### 4.3.3 Alkohol, Rauchen und HPV-Status

Bekannte Faktoren zur Entwicklung von Kopf-Hals-Karzinomen sind Alkohol, Rauchen und HPV-Infektionen. Diese werden in der statistischen Auswertung einzeln dargestellt.

#### 4.3.3.1 Alkohol

Patienten, die eine positive Alkoholanamnese aufwiesen, zeigten durchschnittlich eine kürzere Gesamtüberlebenszeit von 51,3 Monaten [KI: 42,8 – 59,9] gegenüber Patienten ohne gesteigerten Alkoholkonsum mit 58,0 Monaten [KI: 49,5 – 66,5] ( $p=0.808$ ). Obwohl bei fehlender Alkoholanamnese eine höhere 2-Jahres-Überlebensrate von 83,9% gegenüber 73,9%, bzw. ein 5-Jahres-Überleben von 79,2% gegenüber 56,5% beobachtet wurde, zeigte sich dieser protektive Effekt des Alkoholverzichts im Log-Rank Test statistisch nicht signifikant im Gruppenvergleich ( $p=0.281$ ). [Siehe Abbildung 3].

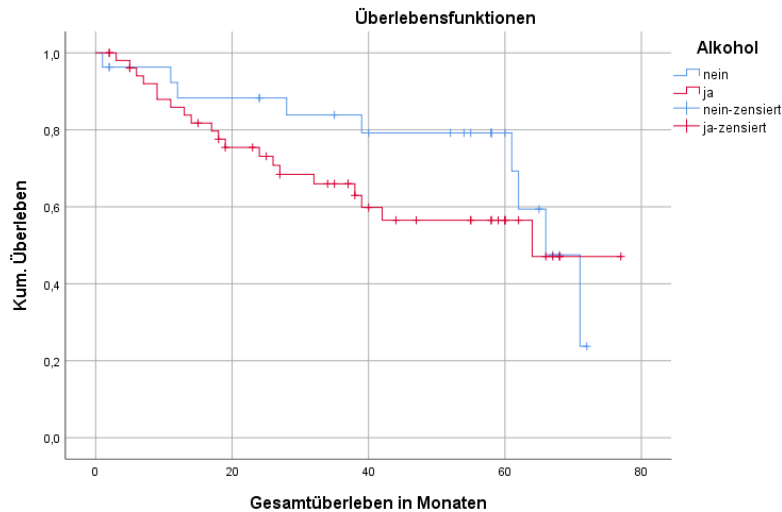


Abbildung 3: Gesamtüberleben getrennt nach Alkoholkonsum

#### 4.3.3.2 Rauchen

Der Großteil der Patienten besaß mit 78,8% eine positive Raucheranamnese, wobei Rauchen signifikant mit längerem Überleben assoziiert war ( $p=0.045$ ). Nichtraucher verstarben mit 58,8% fast doppelt so häufig als Raucher mit 30,2%. Insgesamt zeigten Raucher eine 2-Jahres-Überlebensrate von 84,5 % gegenüber 56,3% bei Nichtrauchern, bzw. eine 5-Jahres-Überlebensrate von 73,1% gegenüber 36,5%. Mit einem längeren Gesamtüberleben von durchschnittlich 56,1 Monaten [KI: 49,9 – 62,2] gegenüber 39,9 Monaten [KI: 25,4 – 54,4] zeigte sich im Log-Rank Test ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zu Gunsten der Raucher ( $p=0.020$ ). [Siehe Abbildung 4].

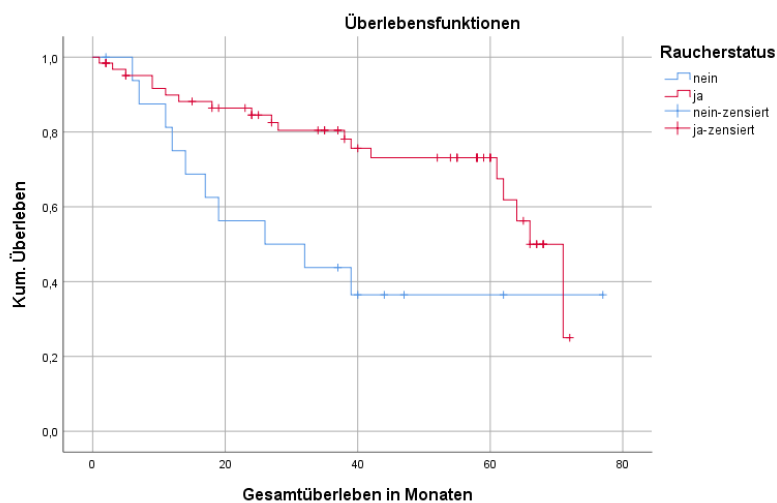


Abbildung 4: Gesamtüberleben getrennt nach Raucherstatus



### 4.3.3.3 HPV-Status

Insgesamt konnte bei 59 Patienten des Gesamtkollektives ein HPV-Status bestimmt werden. Dieser war in 57,6% der Fälle negativ und in 42,4% positiv. Patienten mit HPV-positivem Tumorstatus hatten eine längere durchschnittliche Überlebenszeit von 53,5 Monaten [KI: 42,6 – 64,4] gegenüber 49,6 Monaten [KI: 41,2 – 58,1] bei HPV-negativem Status. Dieser Unterschied zeigte sich statistisch allerdings nicht signifikant ( $p=0.790$ ). Im Log-Rank Test unterschied sich das 2-Jahres-Überleben mit 77,0% gegenüber 79,8% zugunsten des positiven HPV-Status. Das 5-Jahres-Überleben unterschied sich mit 65,3% bei HPV-negativem Status gegenüber 61,1% bei HPV-positivem Status statistisch nicht voneinander ( $p=0.748$ ). [Siehe Abbildung 5].

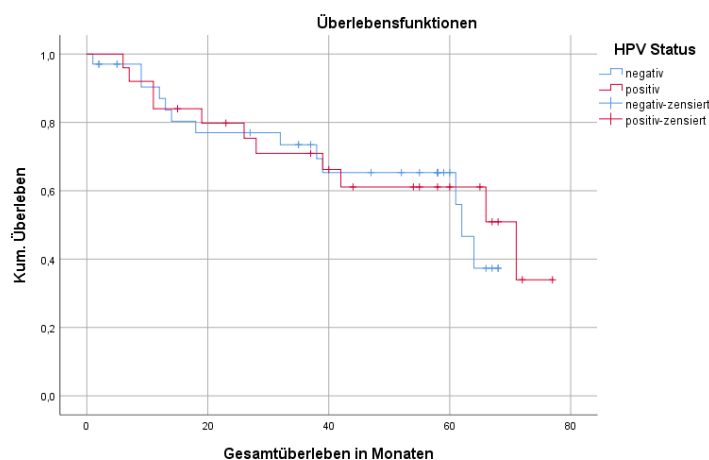


Abbildung 5: Gesamtüberleben getrennt nach HPV-Status

### 4.3.4 Histologischer Grad der Differenzierung, TNM-Status und UICC-Stadien

#### 4.3.4.1 Histologischer Grad der Differenzierung

Obwohl kein Patient der gut differenzierten Gruppe im Beobachtungszeitraum verstorben ist, während 37,1% der mäßig differenzierten und 46,2% der schlecht differenzierten Karzinome zum Tod führten, wies das Kollektiv im Vergleich des Differenzierungsgrades in Bezug auf das Gesamtüberleben keine statistisch signifikanten Unterschiede auf ( $p=0.201$ ). Patienten mit gut differenzierten Karzinomen hatten ein mittleres Überleben von 40,6 Monaten [KI: 8,0 - 73,2; Median 37,0], Patienten mit mäßig differenzierten Karzinomen von durchschnittlich 37,5 Monaten [KI: 31,7 - 43,2; Median 37,5] und schlecht differenzierten Karzinomen von 35,7 Monaten [KI: 21,3 - 50,1; Median 39,0]. Während das 2-Jahres-Überleben der gut differenzierten Gruppe 100% betrug, innerhalb der mäßig differenzierten Gruppe bei 79,1% lag, zeigte es sich bei schlecht differenzierten Karzinomen mit 67,3% am geringsten. Für 5-Jahre konnte ein vergleichbarer Trend mit 100%, 63,9% und 57,7% beobachtet werden. Diese Unterschiede konnten im Log-Rank Test kein Signifikanzniveau erreichen ( $p=0.283$ ). [Siehe Abbildung 6].

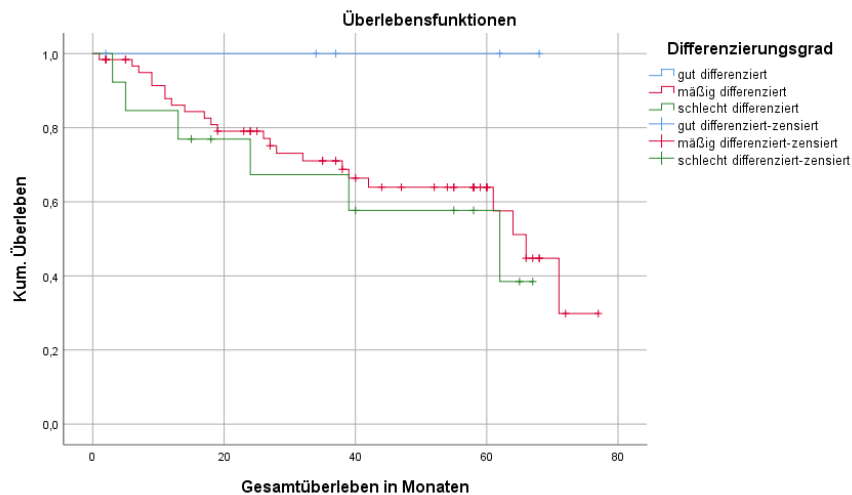


Abbildung 6: Gesamtüberleben getrennt nach Grad der Differenzierung

#### 4.3.4.2 T-Stadium

Im Gesamtkollektiv lagen 65,0% der Tumoren im T1/T2-Stadium und 35,0% im T3/T4 Stadium vor. Das mittlere Überleben unterschied sich im Chi-Square Test signifikant und betrug im T1/T2-Stadium 58,7 Monate [KI: 51,4 – 66,0], während es im T3/T4-Stadium bei lediglich 43,5 Monaten lag [KI: 33,2-53,8] ( $p=0.028$ ). Patienten der niedrigen T-Stadien verstarben mit 26,9% seltener als Patienten der höhergradigen T-Stadien mit 53,6% ( $p=0.049$ ). Das 2-Jahres-Überleben lag in der niedrigen T-Stadien Gruppe bei 86,9%, während es bei den höheren T-Stadien nur 64,3% betrug. Das 5-Jahres-Überleben lag bei 75,6% bzw. 48,4%. [Siehe Abbildung 7].

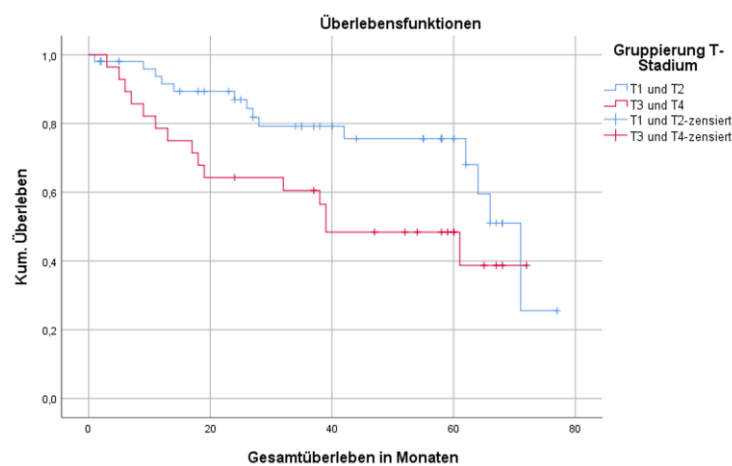


Abbildung 7: Gesamtüberleben getrennt nach T-Stadium Gruppe

#### 4.3.4.3 Nodalstatus

Eine Tumordinfiltration in die (loko-) regionären Lymphknoten (n=31) war mit einem statistisch signifikant kürzeren Gesamtüberleben im Vergleich zu der Gruppe der nodal negativen (n=49) Patienten (**p=0.015**) assoziiert. Patienten, bei denen keine Lymphknotenbeteiligung (pN0) festgestellt wurde, lebten mit durchschnittlich 56,4 Monaten [KI: 50,6 – 62,3] länger gegenüber Patienten mit Lymphknotenbefall (pN+) mit 43,4 Monaten [KI: 33,0 – 53,8]. Innerhalb der nodal positiven Gruppe zeigte sich ebenfalls in der Subanalyse ein Überlebensunterschied: Bei Patienten mit pN1-Status betrug die Überlebenszeit durchschnittlich 49,0 Monate (KI: 28,0 – 70,0), während Patienten mit pN2-Status durchschnittlich lediglich 40,1 Monate [KI: 48,1 – 60,0] überlebten. Dieser Unterschied zwischen allen drei Gruppen zeigte sich im Log-Rank Test statistisch signifikant (**p=0.014**). Das 2-Jahres-Überleben bei nodal negativen Patienten lag bei 90,1 %, während es bei positivem Lymphknotenstatus bei lediglich 61,3% lag, wovon sich der pN1-Status mit 66,7% und der pN2-Status mit 59,1% unterschieden. Das 5-Jahres-Überleben zeigte sich mit 76,2% gegenüber 48,5%, wobei ein pN1-Status mit 55,6% gegenüber pN2-Status mit 45,5% günstiger festgestellt wurde. [Siehe Abbildungen 8 und 9].

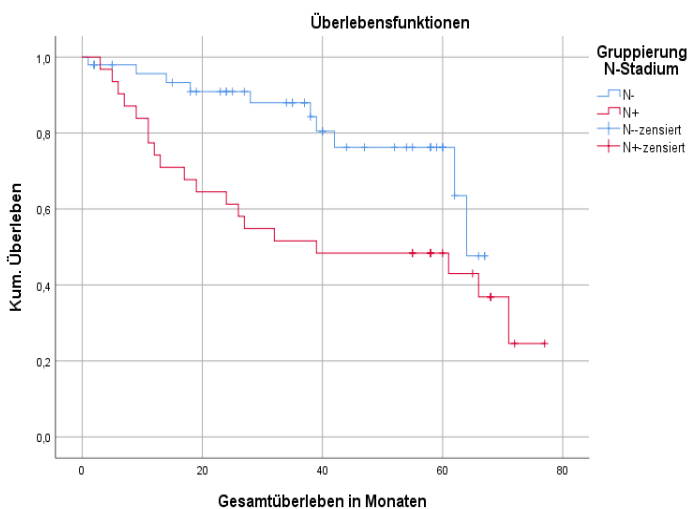


Abbildung 8: Gesamtüberleben getrennt nach N-Stadium Gruppe

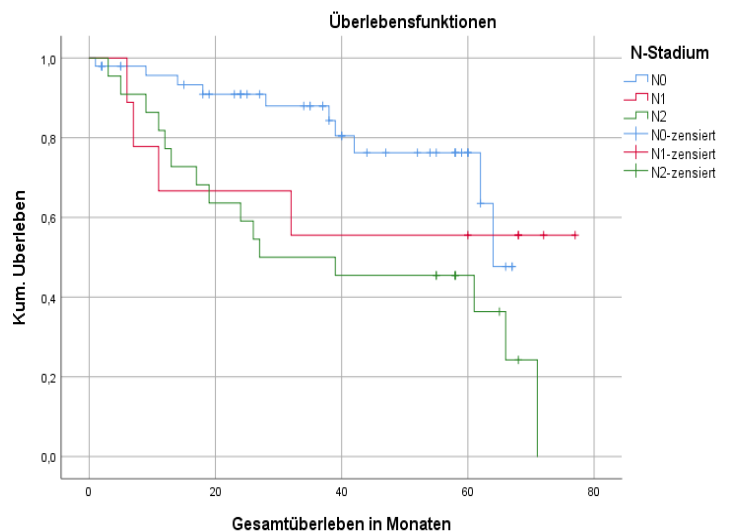


Abbildung 9: Gesamtüberleben getrennt nach N-Stadium

#### 4.3.4.4 UICC-Stadium

Das UICC-Stadium wies bei Stadieneinteilung I/II gegenüber III/IV einen hochsignifikanten Überlebensunterschied auf (**p=0.000**).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten im Stadium I/II war im Beobachtungszeitraum mit 86,5% beinahe doppelt so hoch im Vergleich zu 44,2% im Stadium III/IV. Patienten mit niedrigem UICC-Stadium I/II zeigten eine 2-Jahres-Überlebensrate von 94,1% gegenüber

Patienten im Stadium III/IV mit lediglich 67,4% und eine 5-Jahres-Überlebensrate von 82,1% gegenüber 53,2%. Im Log-Rank Test zeigte sich das durchschnittliche Überleben bis zum Todeseintritt innerhalb der niedrigen UICC-Gruppe mit 58,9 Monaten [KI: 52,4 – 65,3] signifikant länger als bei Vorliegen der hohen Stadiengruppe mit lediglich 46,8 Monaten [KI: 38,2-55,4] ( $p=0.014$ ). Dieser Unterschied zeigte sich hochsignifikant in Bezug auf die Subgruppen I, II, III, IVa und IVb ( $p=0.000$ ), mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit bis zum Tod im Stadium I von 60,4 Monaten (KI: 53,2 – 66,6) gegenüber Stadium IVb von 20,0 Monaten (KI: 6.1 – 7,6). Patienten im Stadium I hatten eine 2-Jahres-Überlebensrate von 94,1% und im Stadium II von 92,3%. Demgegenüber lag sie im Stadium III bei 75,0%, im Stadium IVa bei 78,6% und im Stadium IVb bei lediglich 25,0%. Das 5-Jahres-Überleben beträgt 83,7%, 79,1%, 75,0%, 59,9% und 12,5%. [Siehe Abbildung 10].

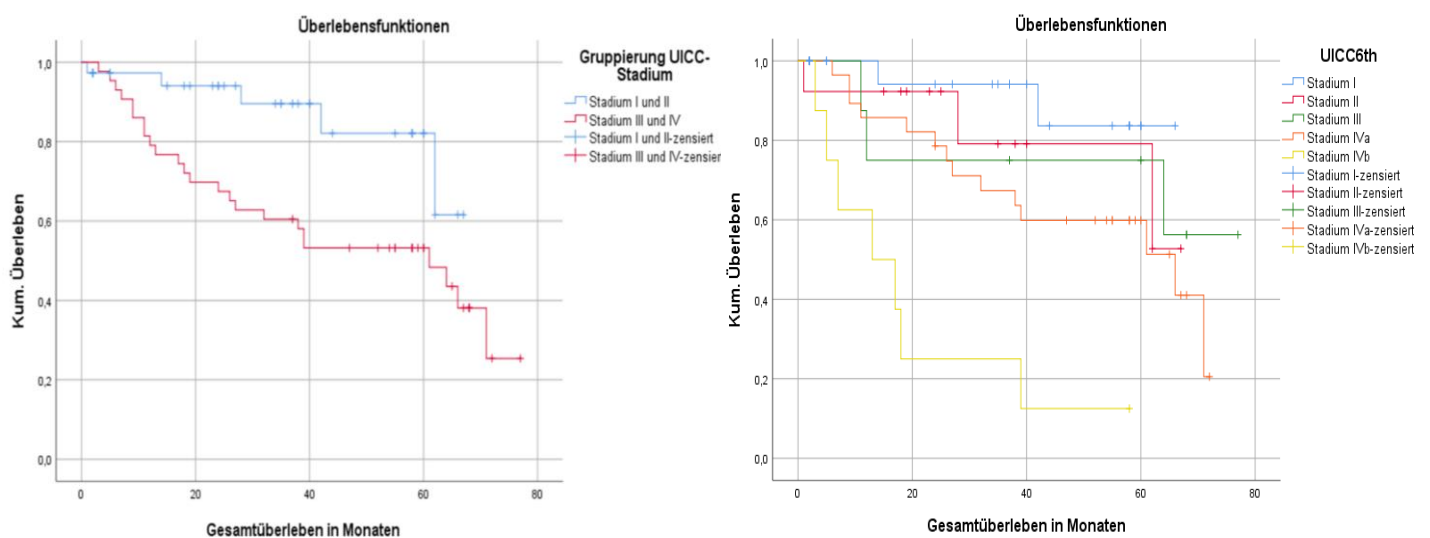


Abbildung 8: Gesamtüberleben getrennt nach UICC-Stadium Gruppe (links) und UICC-Stadium (rechts)

#### 4.3.4.5 Extranodale Extension

Mit 61,25% konnte bei dem Großteil der Patienten keine Lymphknotenbeteiligung festgestellt werden. Von den verbleibenden 38,75% der Patienten wiesen 41,9% ein extrakapsuläres Wachstum auf. Es zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied für das Gesamtüberleben in Bezug auf das Fehlen gegenüber dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und der Sub-Unterscheidung nach Extranodaler Extension ( $p=0.001$ ).

Patienten ohne Lymphknotenbefall ( $N-$ ) zeigten das beste 2-Jahres-Überleben mit 90,1%, während es bei nodal-und-ece-positiven Patienten ( $N+/ece+$ ) 69,2% und bei nodal-positiven-und-ece-negativen ( $N+/ece-$ ) Patienten lediglich 55,6% betrug. Für das 5-Jahres-Überleben zeigte sich innerhalb des Kollektivs ein Unterschied von 76,2%, 53,8% zu 44,4%. Dieser Unterschied zeigte sich ebenfalls signifikant im Log-Rank Test ( $p=0.041$ ). Die durchschnittliche

Überlebenszeit bis zum Todeseintritt bei *N*- Patienten betrug 56,4 Monate [KI: 50,6 – 62,2] gegenüber *N*+/*ece*+ Patienten mit 46,8 Monaten [KI: 32,5 - 61,1]. *N*+/*ece*- Patienten lebten mit 40,7 Monaten [KI: 26,5 – 55,0] am kürzesten. [Siehe Abbildung 11].

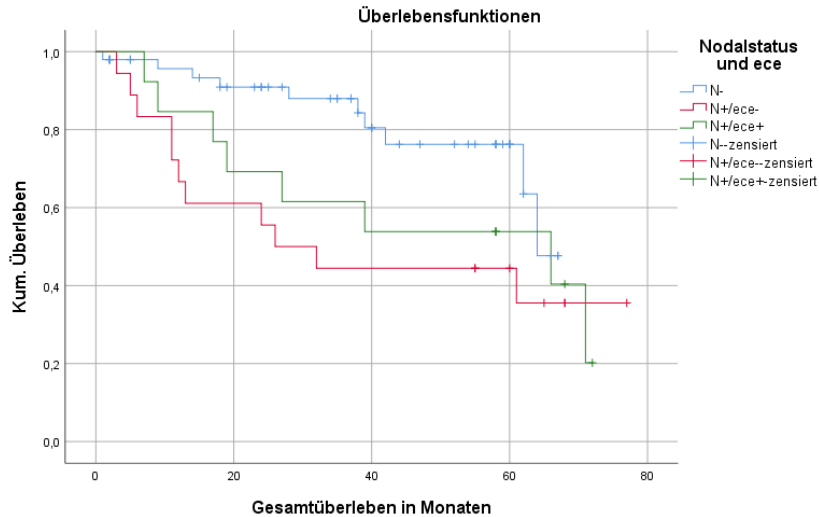


Abbildung 9: Gesamtüberleben getrennt nach Nodalstatus und Extranodalexension

#### 4.3.4.6 Lymphangiosis

Bei 85,0% der Patienten konnte histopathologisch keine Lymphangiosis festgestellt werden (*L0*), während 15,0% Tumorabsiedlungen ins Lymphgefäßsystem (*L1*) aufwiesen.

Bei histopathologischem Vorliegen einer Lymphangiosis zeigten Patienten ein durchschnittliches Überleben bis zum Todeseintritt von lediglich 35,1 Monaten [KI: 18,1 - 52,2] gegenüber 58,0 Monaten [KI: 51,3 – 64,8] bei *L0*-Status (**p=0.004**).

Aus der Gruppe der Patienten mit *L0*-Status verstarben im Nachbeobachtungszeitraum 29,4%, während 75,0% der Patienten mit *L1*-Status verstarben. Dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant (**p=0.007**). Hierbei zeigte sich eine 2-Jahres-Überlebensrate von 83,9% ohne und von 48,6% bei Vorliegen einer Lymphangiosis. Das 5-Jahres-Überleben im Stadium *L0* war mit 69,9% gegenüber des Stadiums *L1* mit 36,5% beinahe verdoppelt. [Siehe Abbildung 12].

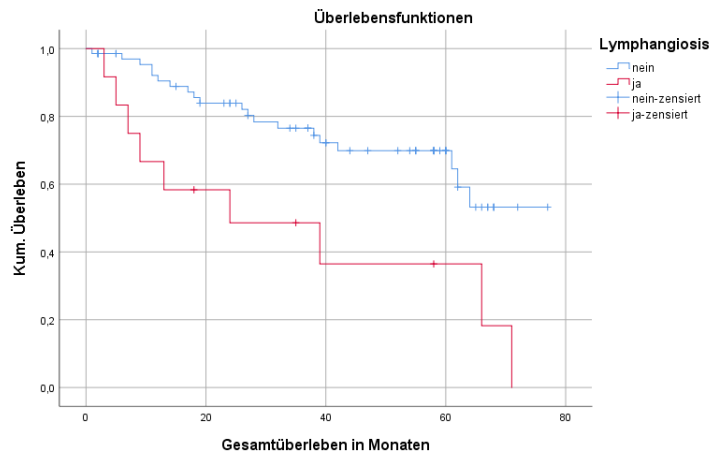


Abbildung 10: Gesamtüberleben getrennt nach Lymphangiosisstatus

#### 4.3.4.7 Resektionsrand

Für das Gesamtkollektiv zeigte sich in der histologischen Aufarbeitung bei 81,25% der Patienten eine vollständige Tumorresektion (*R0*). Es konnte knapp kein signifikanter Überlebensunterschied ( $p=0.146$ ) im Vergleich zu unvollständiger Resektion (*R1*) in Bezug auf das Gesamtüberleben notiert werden. Allerdings verstarben Patienten mit *R0*-Status in nur 32,3% der Fälle, während Patienten mit *R1*-Status in 53,3% der Fälle innerhalb des Beobachtungszeitraums verstarben. Insgesamt zeigten Patienten mit *R0*-Resektion ein besseres 2-Jahres Überleben von 81,2% gegenüber 66,7% bei *R1*-Status und ein 5-Jahres-Überleben von 66,1% gegenüber 58,3%. Dennoch konnte statistisch kein signifikanter Unterschied der durchschnittlichen Überlebenszeit bei *R0*-Status mit 55,7 Monaten [KI: 48,6 – 62,8] im Vergleich eines *R1*-Status mit 43,7 Monaten [KI: 30,3 – 57,2] festgestellt werden ( $p=0.176$ ). [Siehe Abbildung 13].

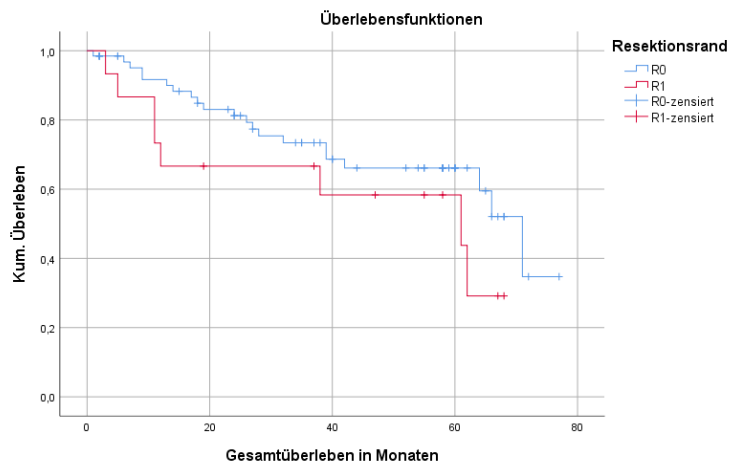


Abbildung 11: Gesamtüberleben getrennt nach Resektionsstatus

### 4.3.5 Adjuvante Therapie

Der Empfehlung des interdisziplinären Tumorboards folgend erhielten einige Patienten eine adjuvante Therapie als Radiatio oder Radiochemotherapie. Die durchschnittliche Überlebensdauer der Patienten unterschied sich innerhalb der Gruppen *Keine Adjuvanz*, *Adjuvante Radiotherapie* und *Adjuvante kombinierte Radiochemotherapie*. Patienten ohne adjuvante Therapie, wiesen das längste Gesamtüberleben mit durchschnittlich 60,2 Monaten [KI: 50,6 – 69,8] auf. Patienten mit alleiniger adjuvanter Radiotherapie zeigten ein mittleres Überleben von 48,2 Monaten [KI: 38,8 – 57,6] und mit adjuvanter kombinierter Radiochemotherapie von 48,6 Monaten [KI: 37,1 – 60,0]. Dieser Unterschied zeigte sich im Log-Rank Test allerdings nicht statistisch signifikant ( $p=0.417$ ).

Das 2-Jahres-Überleben bei Patienten ohne Adjuvanz betrug 91,7%, während es bei alleiniger Radiotherapie bei 75,6% und bei kombinierter Radiochemotherapie bei 69,6% lag. Das 5-Jahres-Überleben betrug 74,9%, 60,3% und 59,5%. Auch innerhalb der Gruppenunterscheidung *Adjuvanz* gegenüber *keine Adjuvanz* zeigte sich statistisch knapp kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben ( $p=0.107$ ). [Siehe Abbildung 14].

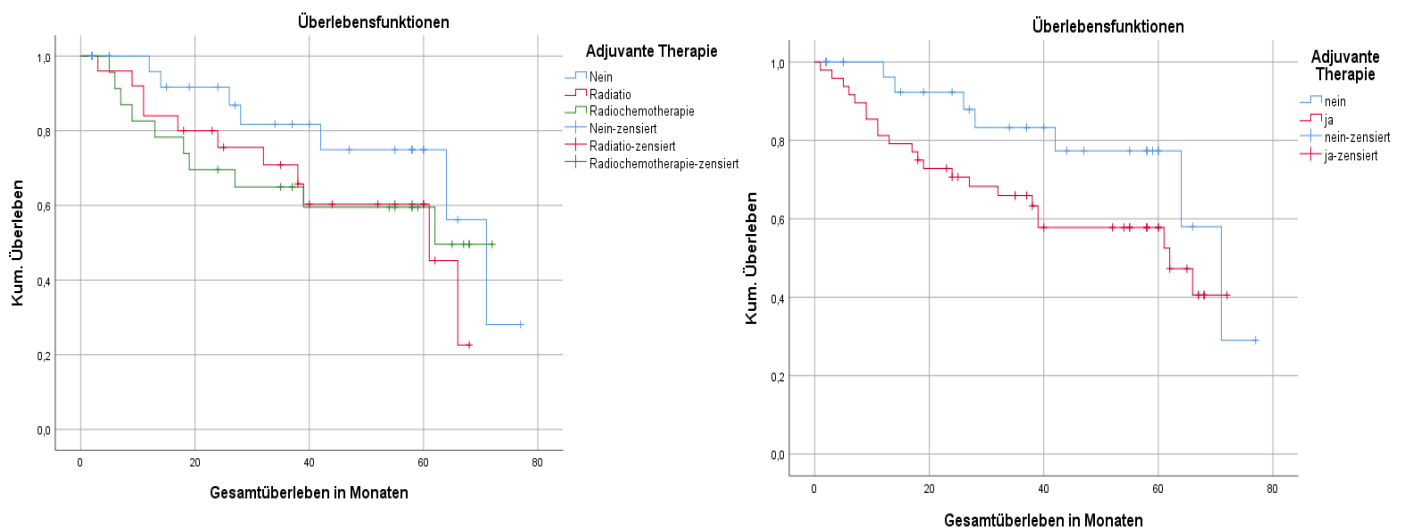


Abbildung 12: Gesamtüberleben getrennt nach Adjuvanzform (links) und Adjuvanzstatus (rechts)

### 4.3.6 Bestrahlungsdosis

Die Hälfte des Gesamtkollektives erhielt eine adjuvante Therapie mit Radiatio. Von diesen 40 Patienten, die adjuvant bestrahlt wurden, erhielten sieben Patienten eine kumulierte Dosis von 50,4 bis 59,4 Gy, 26 Patienten 59,4 Gy, sowie sieben Patienten eine Gesamtreferenzdosis (GRD) von über 59,4 Gy bis 69,6 Gy. Patienten der niedrigen Bestrahlungsdosisgruppe zeigten das längste Gesamtüberleben von 51,9 Monaten bis zum Tod [KI: 37,1 – 66,6]. Patienten, die mit 59,4 Gy bestrahlt wurden, lebten durchschnittlich 46,2 Monate [KI: 24,4 – 64,7] und Patienten

der Hochdosisgruppe 44,6 Monate [KI: 24,4 – 64,7]. Das 2-Jahres-Überleben lag in der Niedrigdosisgruppe bei 85,7%, in der mittleren Dosisgruppe bei 61,1% und in der Hochdosisgruppe bei 71,4%. Für das 5-Jahres-Überleben wurden 85,7%, 52,9% und 35,7% notiert, ohne eine statistisch signifikante Relevanz zu zeigen ( $p=0.485$ ). [Siehe Abbildung 15].

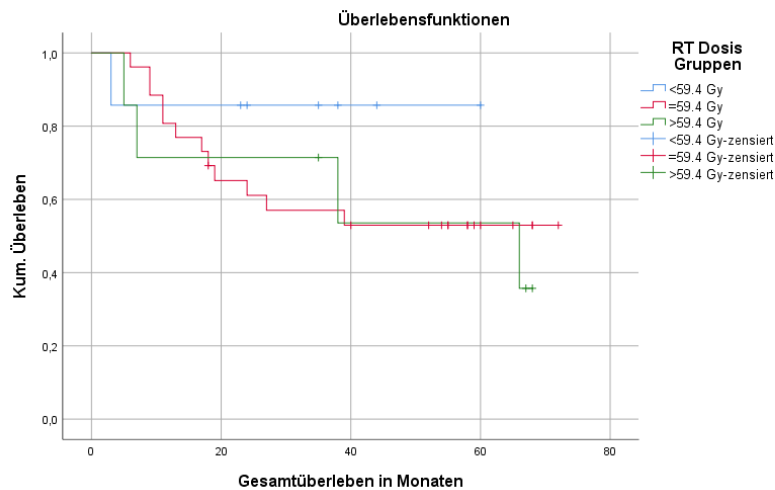


Abbildung 13: Gesamtüberleben getrennt nach Bestrahlungsdosis (RT Dosis)

### 4.3.7 Molekularpathologische Untersuchungen

#### 4.3.7.1 EGFR

Das Gesamtüberleben der Patienten innerhalb der Gruppen nach histopathologischem Grad der Expression von EGFR unterschied sich statistisch nicht voneinander ( $p=0.593$ ). In der Beobachtungszeit verstarben 27,5%, 50,0%, 37,5% und 35,7% der Patienten in steigender EGFR-Expressionsgradreihe.

Patienten ohne EGFR-Expression zeigten ein Gesamtüberleben von durchschnittlich 59,4 Monaten [KI: 50,0 – 68,7], mit schwacher Expression von 46,9 Monaten [KI: 31,3-62,5], mit moderater Expression von 49,2 Monaten [KI: 37,2-61,3] und mit starker Expression von 49,8 Monaten [KI: 39,2 - 60,6]. Das 2-Jahres-Überleben lag bei fehlender EGFR-Expression bei 95,5%, bei schwacher Expression bei 68,4%, bei moderater Expression bei 75,0% und bei starker Expression bei 73,0%. Das 5-Jahres-Überleben wurde mit 83,5%, 49,9%, 67,5% und 56,2% beobachtet. Dennoch zeigten sich im Log-Rank Test die Auswertungen zwischen den Gruppen als statistisch nicht signifikant zueinander ( $p=0.738$ ). [Siehe Abbildung 16].



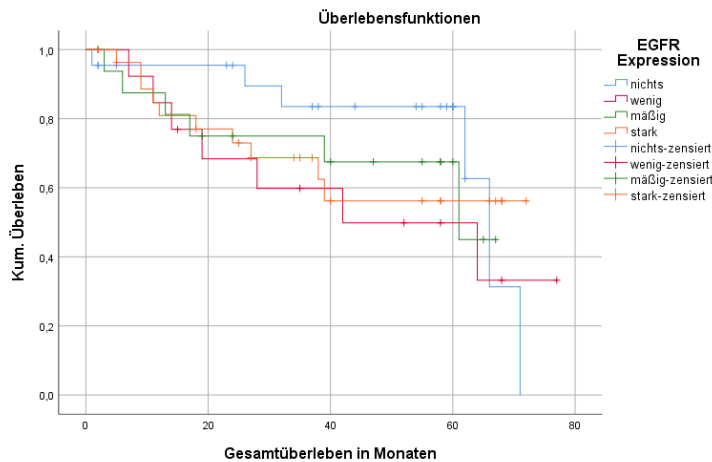


Abbildung 14: Gesamtüberleben getrennt nach EGFR-Expression

#### 4.3.7.2 VEGF

Das Gesamtüberleben der Patienten zeigte getrennt nach histopathologischem Grad der Expression von VEGF2 statistisch keine signifikanten Unterschiede zueinander ( $p=0.174$ ). In der Beobachtungszeit sind 36,4%, 33,3%, 33,3% und 100% der Patienten in steigender Expressionsgradreihe verstorben.

Patienten ohne VEGF2-Expression zeigten ein Gesamtüberleben von durchschnittlich 48,8 Monaten [KI: 35,4 – 62,3], mit schwacher Expression von 53,9 Monaten [KI: 44,2 – 63,5], moderater Expression von 52,9 Monaten [KI: 43,7 – 62,1] und starker Expression von 47,3 Monaten [KI: 9,4 – 85,2]. Im Log-Rank Test zeigten sich diese Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant ( $p=0.759$ ). Das 2-Jahres-Überleben lag bei fehlender VEGF2-Expression bei 78,8%, bei schwacher Expression bei 77,0%, bei moderater Expression bei 81,8% und bei starker Expression bei 66,7%. Das 5-Jahres-Überleben wurde mit 63,0%, 63,4%, 66,6% und 33,3% festgestellt. [Siehe Abbildung 17].

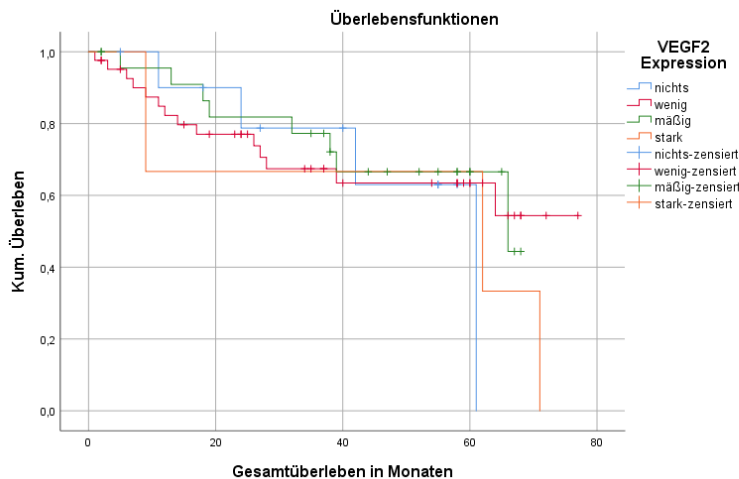


Abbildung 15: Gesamtüberleben getrennt nach VEGF2-Expression

#### 4.3.7.3 Moesin

Das Gesamtüberleben der Patienten unterscheidet sich innerhalb der Gruppen nach histopathologischem Grad der Expression von Moesin statistisch hochsignifikant voneinander ( $p=0.000$ ). Keiner der Patienten ohne Nachweis einer Moesin-Expression ist verstorben, während 11,1% der schwach und 26,1% der moderaten, sowie 68,0% der stark exprimierenden Gruppe innerhalb der Beobachtungszeit verstarben. Das 2-Jahres-Überleben der Patienten unterschied sich im Log-Rank Test statistisch signifikant voneinander ( $p=0.031$ ) und lag bei fehlender Expression bei 100%, bei schwacher Expression bei 93,8%, bei moderater Expression bei 84,7% und bei starker Expression bei 55,4%. Das 5-Jahres-Überleben wurde mit 100%, 86,5%, 84,7% und 30,8% beobachtet. [Siehe Abbildung 18].

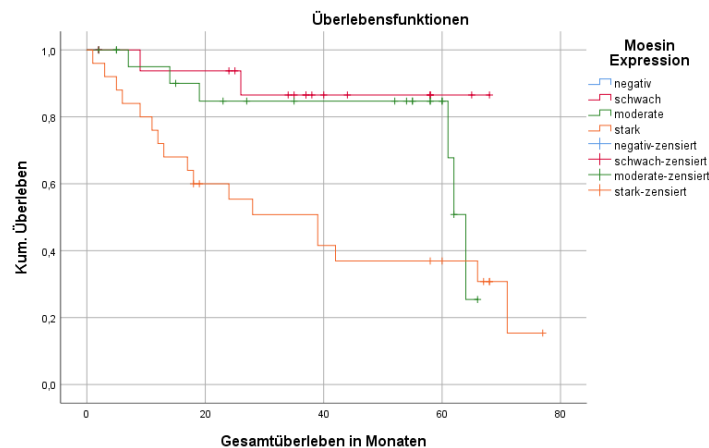


Abbildung 16: Gesamtüberleben getrennt nach Moesin-Expression

#### 4.3.7.4 PKM2

Das Gesamtüberleben der Patienten unterschied sich innerhalb der Gruppen nach histopathologischem Grad der Expression von PKM2 statistisch nicht voneinander ( $p=0.747$ ). In der Beobachtungszeit sind 22,2%, 31,8%, 39,4% und 44,4% der Patienten in steigender PKM2-Expressionsgradreihe verstorben.

Dabei besaßen Patienten ohne PKM2-Expression durchschnittlich eine Gesamtüberlebenszeit bis zum Tod von 47,0 Monaten [KI: 31,1 - 62,8], mit schwacher Expression von 57,5 Monaten [KI: 47,2 - 67,8], moderater Expression von 55,6 Monaten [KI: 46,5 - 64,7] und starker Expression von 37,7 Monaten [KI: 22,9 - 52,4]. Im Log-Rank Test zeigten sich diese Unterschiede zwischen den Gruppen als nicht signifikant zueinander ( $p=0.607$ ). Das 2-Jahres-Überleben lag bei fehlender PKM2-Expression bei 76,2%, bei schwacher Expression bei 84,2%, bei moderater Expression bei 81,4% und bei starker Expression bei 66,7%. Das 5-Jahres-Überleben betrug 76,2%, 77,2%, 63,8% und 44,4%. [Siehe Abbildung 19].

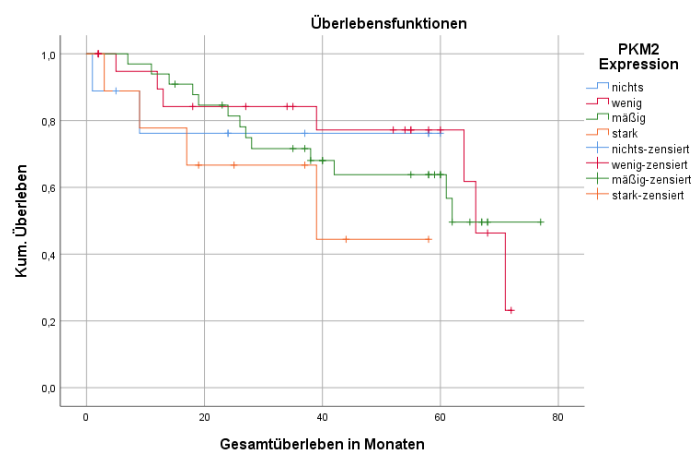


Abbildung 17: Gesamtüberleben getrennt nach PKM2-Expression

#### 4.3.7.5 COX-2

Das Gesamtüberleben der Patienten unterschied sich innerhalb der Gruppen nach histopathologischem Grad der Expression von COX-2 statistisch nicht voneinander ( $p=0.483$ ). In der Beobachtungszeit sind 46,7%, 31,0%, 42,3% und 20,0% der Patienten in steigender COX-2-Expressionsgradreihe verstorben. Patienten ohne COX-2-Expression zeigten das kürzeste Gesamtüberleben mit durchschnittlich 46,7 Monaten [KI: 32,5 – 60,9], mit schwacher Expression von 49,2 Monaten [KI: 39,9 – 58,6], moderater Expression von 52,6 Monaten [KI: 42,1 – 63,2] und starker Expression von 60,6 Monaten [KI: 48,2 – 73,0]. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen im Log-Rank Test festgestellt werden ( $p=0.466$ ). Das 2-Jahres -Überleben bei fehlender COX-2-Expression lag mit 66,7% am niedrigsten und stieg bei schwacher Expression auf 76,0%, bei moderater Expression auf 83,1% und lag bei starker Expression mit 90,0% am höchsten. Das 5-Jahres Gesamtüberleben wurde mit 59,3%, 65,0%, 59,1% und 90,0% beobachtet. [Siehe Abbildung 20].

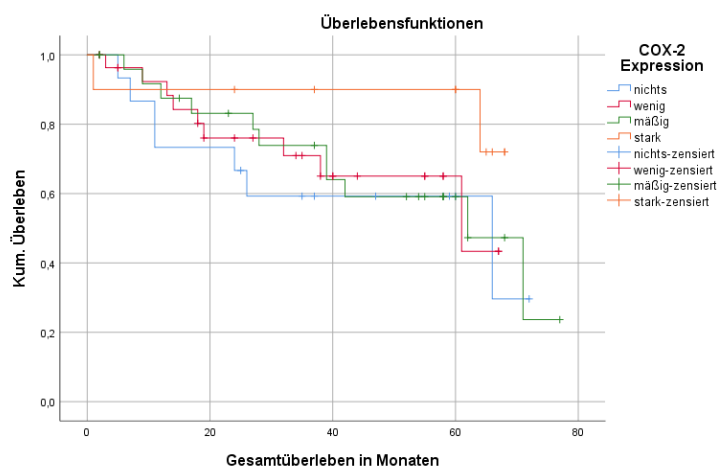


Abbildung 18: Gesamtüberleben getrennt nach COX-2-Expression

#### 4.3.7.6 Podoplanin

Das Gesamtüberleben der Patienten unterschied sich innerhalb der Gruppen nach histopathologischem Grad der Expression von Podoplanin hochsignifikant voneinander ( $p=0.000$ ). Patienten ohne Podoplanin-Expression verstarben in lediglich 7,7% der Fälle und mit schwacher Expression in 5,6%, während bei mäßiger Expression in 43,3% und bei Vorliegen einer starken Expression sogar in 73,7% der Fälle ein Tod beobachtet wurde.

Patienten ohne Podoplanin-Expression zeigten ein Gesamtüberleben von durchschnittlich 54,9 Monaten [KI: 47,3 – 62,6], mit schwacher Expression von 64,1 Monaten [KI: 56,6 – 71,5], moderater Expression von 55,3 Monaten [KI: 46,6 – 64,1] und starker Expression von 31,3 Monaten [KI: 19,5 – 43,2]. Im Log-Rank Test erwiesen sich diese Unterschiede zwischen den Gruppen hoch signifikant ( $p=0.000$ ). Das 2-Jahres-Überleben lag bei fehlender Podoplanin-Expression bei 90,9%, bei schwacher Expression bei 93,3%, bei moderater Expression bei 86,2% und bei starker Expression bei lediglich 47,4%. Das 5-Jahres Gesamtüberleben betrug 90,9%, 93,3%, 64,8% und 30,7%. [Siehe Abbildung 21].

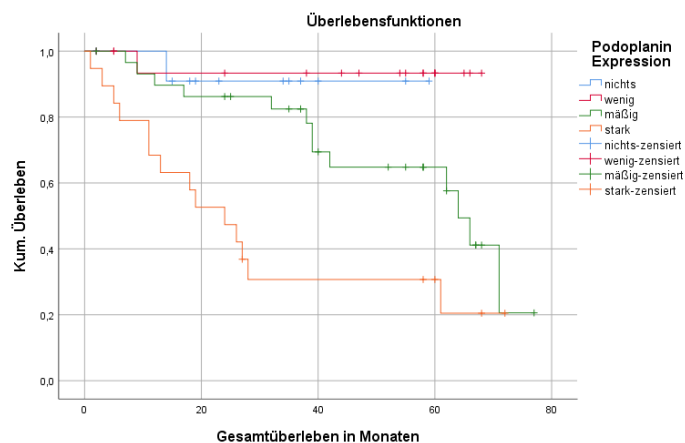


Abbildung 19: Gesamtüberleben getrennt nach Podoplanin-Expression

#### 4.3.7.7 SMR3A

Das Gesamtüberleben der Patienten zeigte innerhalb der Gruppen nach histopathologischem Grad der Expression von SMR3A statistisch hoch signifikante Unterschiede zueinander ( $p=0.001$ ). Bei Patienten ohne SMR3A-Expression wurde kein Todesfall beobachtet. Bei schwacher Expression kam es in lediglich 11,1% zum Exitus, während bei mäßiger Expression in 40,0% und bei Vorliegen einer starken Expression in 85,7% der Fälle ein Tod beobachtet wurde. Sowohl das 2- und 5-Jahres-Überleben lagen bei fehlender SMR3A-Expression bei 100%, bei schwacher Expression bei 88,9%, bei moderater Expression bei 50,0% und bei starker Expression bei 42,9%. Diese Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich ebenfalls im Log-Rank Test statistisch signifikant ( $p=0.026$ ). [Siehe Abbildung 22].

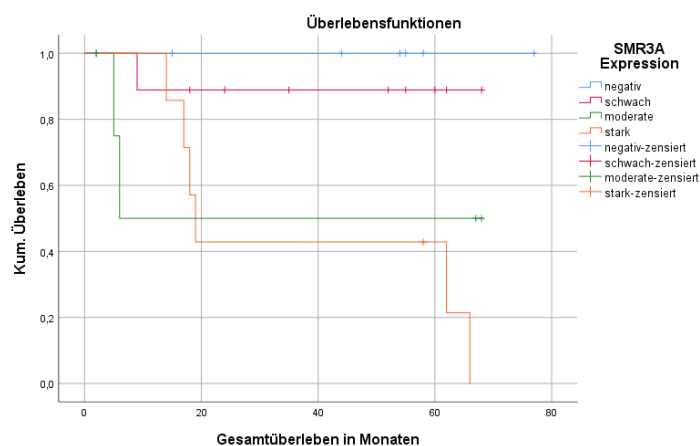


Abbildung 20: Gesamtüberleben getrennt nach SMR3A-Expression

#### 4.3.8 Multiple Lineare Regressionsanalyse

Um die prognostische Aussagekraft pathologischer Faktoren in Bezug auf den klinischen Endpunkt Gesamtüberleben zu untersuchen, wurde ein Cox-Regressions-Modell als Multiple Lineare Regressionsanalyse berechnet. Es wurden die kategorialen Prognoseparameter inkludiert, die sich in der univariaten Untersuchung als signifikant herausgestellt haben.

Diese Parameter sind: T-Stadium, N-Stadium und Extrakapsuläre Extension, UICC-Stadium, Lymphangiosis, Moesin-, Podoplanin- und SMR3A-Expressionsgrad.

Als einziger unabhängiger signifikanter prognostischer Parameter zeigte sich in der Multiplen Linearen Regression SMR3A ( $p=0.002$ ). Für Moesin ( $p=0.074$ ) wurde das Signifikanzniveau knapp verfehlt. Ergebnisse der Multiplen Linearen Regressionsanalyse zeigt *Tabelle 10*.

Einflussvariable	Signifikanz	95.0% Konfidenzintervall	
		Untergrenze	Obergrenze
T-Stadium	0.124	-0.090	0.685
UICC-Stadium	0.163	-0.799	0.145
Lymphangiosis	0.291	-0.171	0.541
Extrakapsuläre Extension	0.363	-0.128	0.333
Moesin	0.074	-0.018	0.363
Podoplanin	0.181	-0.058	0.286
SMR3A	<b>0.002</b>	0.087	0.319

Tabelle 10: Multiple Lineare Regressionsanalyse für den Endpunkt Gesamtüberleben

Bei Ausschluss der Variable SMR3A aufgrund geringer Anzahl an Untersuchungswerten, nahmen die prognostischen Einflussvariablen für Podoplanin ( $p=0.004$ ) und Moesin ( $p=0.024$ ) bezogen auf die abhängige Variable „Tod“ signifikante Werte in der Multiplen Linearen Regression an.

#### 4.4 Erkrankungsfreies Überleben

Patienten, die im Rahmen dieser Auswertung analysiert wurden, zeigten im Chi-Square Test hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens keine Assoziation bezüglich HPV-Status ( $p=0.832$ ), Lymphangiosis ( $p=0.234$ ), Resektionsstatus ( $p=0.343$ ) und der Einleitung einer adjuvanten Therapie ( $p=0.598$ ). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied ( $p=0.086$ ) und Korrelationen zu steigenden T-Stadien ( $p=0.076$ ) wurden statistisch knapp verfehlt. Allerdings zeigte sich eine Assoziation zum Nodalstadium ( $p=0.016$ ), extranodaler Extension ( $p=0.038$ ), UICC-Stadium ( $p=0.007$ ) und tumorassoziertem Tod ( $p<0.001$ ).

Histopathologisches Vorliegen einer Moesin- ( $p=0.016$ ) und Podoplanin-Expression ( $p=0.007$ ) korrelierten signifikant invers mit erkrankungsfreiem Leben, während für SMR3A ( $p=0.102$ ) eine Assoziation im Chi-Square Test knapp verfehlt wurde.

##### 4.4.1 Geschlecht

Die männlichen Patienten zeigten ein durchschnittliches erkrankungsfreies Überleben von 53,3 Monaten [KI: 44,8 – 61,9], während Frauen mit durchschnittlich 36,0 Monaten [KI: 26,3 – 45,8] kürzer ohne Krankheitsprogress lebten. Das weibliche Geschlecht ist prognostisch ungünstiger und zeigte in 55,2% der Fälle einen Progress gegenüber lediglich 35,3% bei Männern ( $p=0.068$ ). Männer zeigten ein 2-Jahres krankheitsfreies Überleben von 73,6%, während es bei Frauen nur 58,0% betrug. Für das 5-Jahresintervall ergab das krankheitsfreie Überleben 61,4% und 31,7%. Die Unterschiede waren im Log-Rank Test statistisch signifikant ( $p=0.025$ ). [Siehe Abbildung 23].

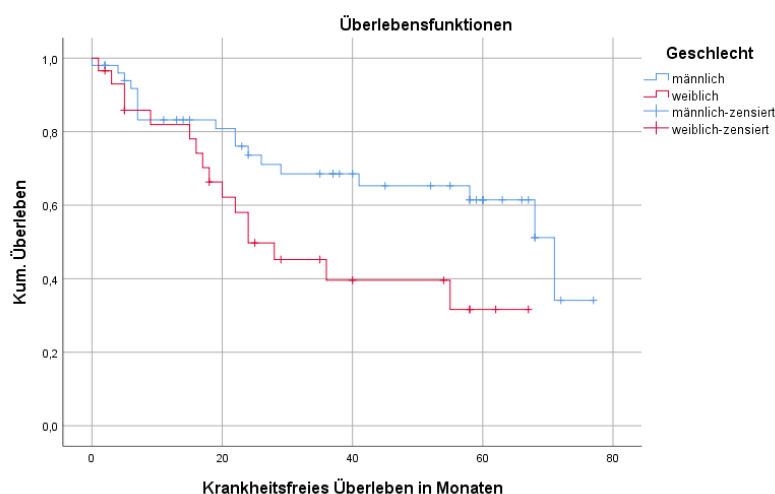


Abbildung 21: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Geschlecht

#### 4.4.2 Alter

In Bezug auf das erkrankungsfreie Überleben zeigten jüngere Patienten ein längeres durchschnittliches Überleben von 55,5 Monaten [KI: 46,2 – 64,9] gegenüber 39,7 Monaten [KI: 30,3 – 49,1] bei älteren Patienten. Das Auftreten eines Krankheitsprogresses wurde mit 34,2% im jüngeren Median seltener beobachtet als mit 61,8% im älteren Kollektiv ( $p=0.179$ ).

Jüngere Patienten hatten insgesamt ein 2-Jahres krankheitsfreies Überleben von 77,3%, während es bei älteren Patienten mit lediglich 58,1% festgestellt wurde. Nach 5 Jahren lag dieser Unterschied bei 59,5% zu 41,7%. Im Log-Rank Test zeigten sich diese Ergebnisse zwischen den Altersgruppen statistisch knapp nicht signifikant zueinander ( $p=0.068$ ). [Siehe Abbildung 24].

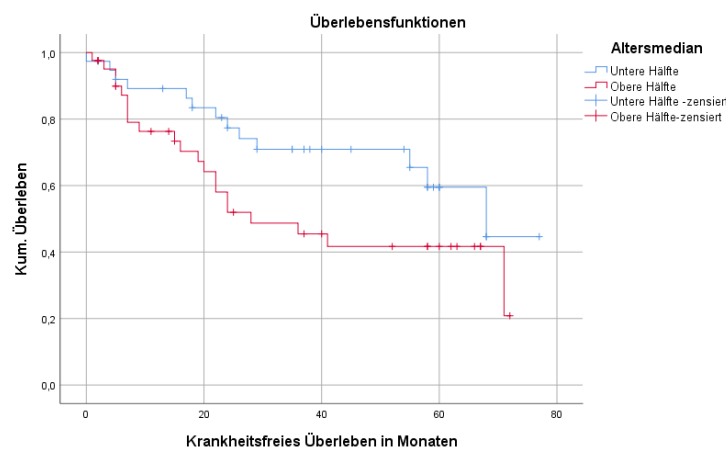


Abbildung 22: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Alter

#### 4.4.3 Alkohol, Rauchen und HPV

##### 4.4.3.1 Alkohol

Patienten, die keine Alkoholanamnese berichteten, zeigten mit 33,3% gegenüber 47,2% seltener einen Progress als Patienten mit positiver Alkoholanamnese ( $p=0.173$ ). Ohne Alkoholanamnese wurde ein durchschnittliches erkrankungsfreies Überleben von 55,0 Monaten [KI: 45,3 – 64,7] erreicht und war damit länger als bei Patienten mit positiver Alkoholanamnese mit 43,5 Monaten [KI: 34,5 – 52,4]. Die 2-Jahres erkrankungsfreie Überlebensrate bei unauffälliger Alkoholanamnese war mit 83,5% höher gegenüber 59,9% mit positiver Alkoholanamnese und wurde mit 61,3% bzw. 45,3% für 5 Jahre ermittelt. Der Log-Rank Test erreichte hierbei keine Signifikanz im Gruppenvergleich ( $p=0.104$ ). [Siehe Abbildung 25].

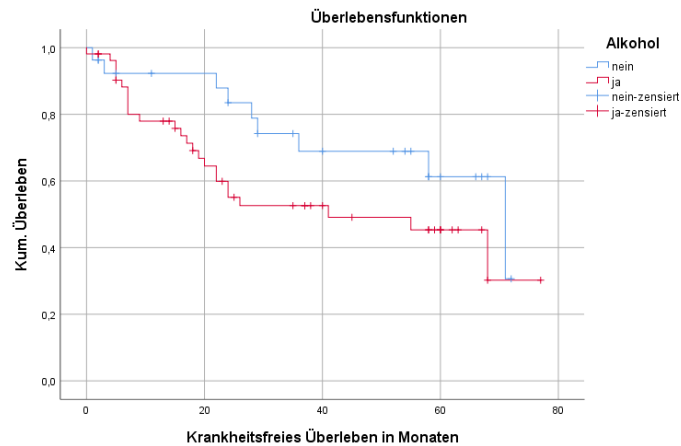


Abbildung 23: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Alkoholkonsum

#### 4.4.3.2 Rauchen

Das krankheitsfreie Gesamtüberleben bei Rauchern lag durchschnittlich bei 49,9 Monaten [KI: 42,9 – 57,0] und bei Nicht-Rauchern bei nur 35,4 Monaten [KI: 19,8 – 50,9] ( $p=0.105$ ). Nichtraucher erlitten mit 58,8% häufiger einen Erkrankungsprogress als 38,1% der Patienten mit positiver Raucheranamnese.

Raucher zeigten mit 77,1% eine höhere 2-Jahres krankheitsfreie Überlebensrate gegenüber Nichtrauchern mit 41,3%. Dieser Trend wurde auch für das 5-Jahres krankheitsfreie Überleben mit 55,6% gegenüber 34,4% festgestellt. Ein statistisch signifikanter Überlebensunterschied wurde im Log-Rank Test allerdings knapp verfehlt ( $p=0.067$ ). [Siehe Abbildung 26].

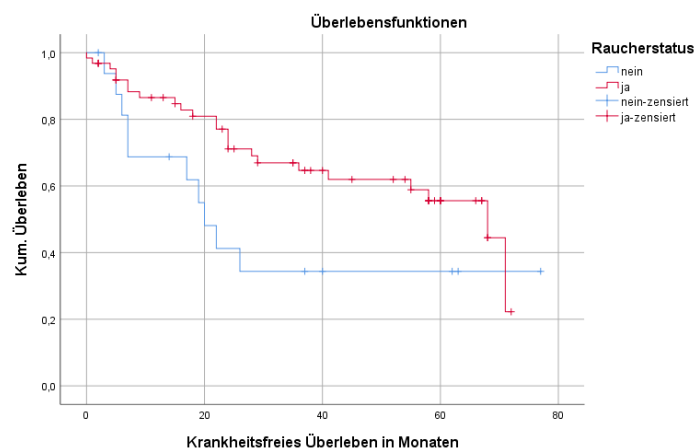


Abbildung 24: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Raucherstatus



#### 4.4.3.3 HPV

Patienten mit HPV-negativem Tumorstatus hatten eine durchschnittlich kürzere erkrankungsfreie Überlebenszeit von 44,5 Monaten [KI: 34,3 – 54,7] gegenüber Patienten mit HPV-positivem Status und einer durchschnittlichen krankheitsfreien Überlebenszeit von 50,4 Monaten [KI: 38,5 – 62,3]. Das Auftreten eines Krankheitsprogresses unterschied sich mit absolut 41,2% bei den HPV-negativen Patienten im Vergleich zu 44,0% bei HPV-positiven Patienten statistisch nicht voneinander ( $p=0.519$ ). Jedoch wurde eine 2-Jahres krankheitsfreie Überlebensrate mit 61,2% bei HPV-negativen gegenüber 75,4% bei HPV-positiven Tumoren und eine 5-Jahres krankheitsfreie Überlebensrate mit 49,4% zu 55,7% festgestellt. Die Ergebnisse zeigten sich im Log-Rank Test jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0.519$ ). [Siehe Abbildung 27].

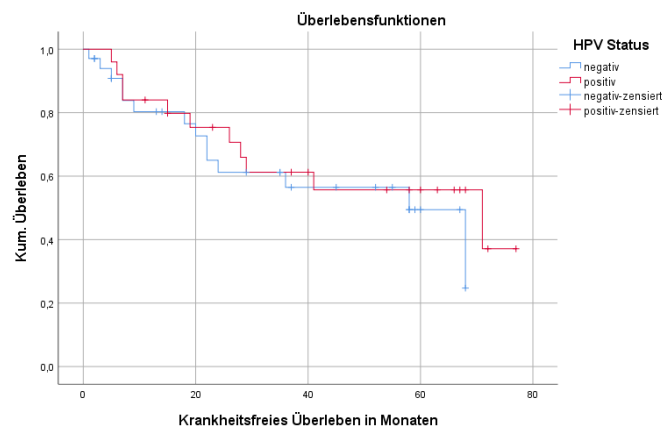


Abbildung 25: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach HPV-Status

#### 4.4.4 Histologischer Grad der Differenzierung, TNM-Status und UICC-Stadien

##### 4.4.4.1 Histologischer Grad der Differenzierung

Der Grad der Differenzierung unterschied sich im Kollektiv in Bezug auf das erkrankungsfreie Intervall nicht ( $p=0.918$ ). Patienten mit gut differenzierten Karzinomen wiesen ein mittleres erkrankungsfreies Überleben von 57,0 Monaten [KI: 30,6 – 83,4], Patienten mit mäßig differenzierten Karzinomen von durchschnittlich 47,2 Monaten [KI: 39,1 - 55,3] und Patienten mit schlecht differenzierten Karzinomen von 43,9 Monaten [KI: 28,6 – 59,1] auf. Patienten mit gut differenzierten Karzinomen erlitten in 40,0% der Fälle innerhalb des Beobachtungszeitraums einen Erkrankungsprogress, während 43,5% der Patienten mit mäßig differenzierten und 38,5% der Patienten mit schlecht differenzierten Karzinomen eine Erkrankungsdynamik aufwiesen. Im Log-Rank Test zeigte sich diesbezüglich kein Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0.941$ ). Das 2- und 5-Jahre Erkrankungsfreie Überleben gruppiert nach Grading belief sich auf 75,0%, 63,9% und 63,5%, bzw. 75,0%, 48,3% und 52,9%. [Siehe Abbildung 28].

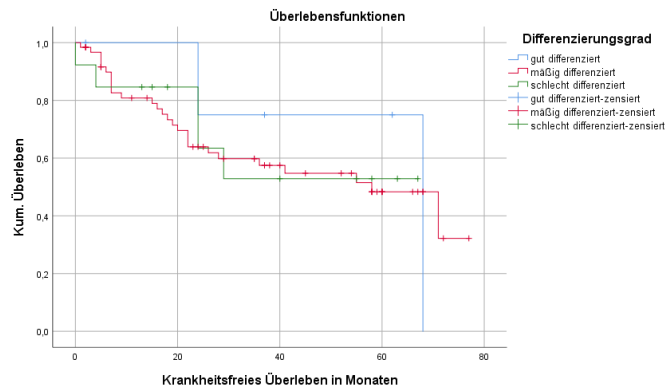


Abbildung 26: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Grad der Differenzierung

#### 4.4.4.2 Tumorstadium

Die krankheitsfreie Lebenszeit der Patienten in  $T1/T2$ -Stadien war mit 50,2 Monaten [KI: 41,4 – 59,1] länger als in den höhergradigen  $T3/T4$ -Stadien mit lediglich 42,1 Monaten [KI: 31,5 – 52,8]. Patienten mit niedrigen T-Stadien entwickelten in 36,5% der Fälle einen Erkrankungsprogress, während mit 53,6% über die Hälfte der Patienten der höhergradigen T-Stadien einen Progress zeigten ( $p=0.109$ ). Das 2-Jahre erkrankungsfreie Überleben in der Gruppe mit niedrigen T-Stadien lag bei 75,6%, während es bei den höheren T-Stadien bei 58,9% lag und für 5 Jahre mit 55,1% und 43,9% beobachtet wurde ( $p=0.298$ ). [Siehe Abbildung 29].

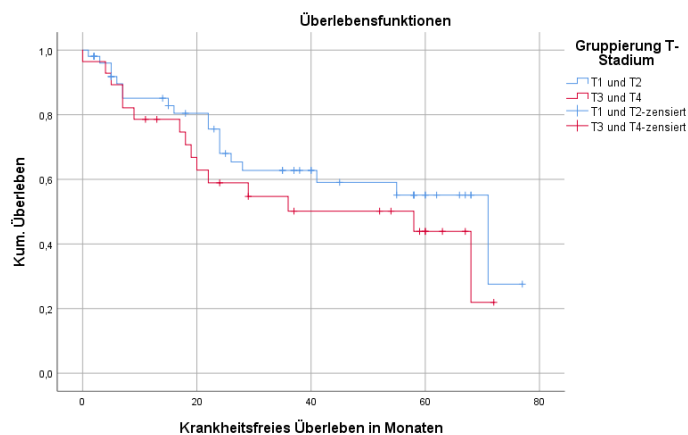


Abbildung 27: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach T-Stadium Gruppe

#### 4.4.4.3 Nodalstatus

Bei Untersuchungen der Infiltration des Tumors in lokoregionäre Lymphknoten zeigte sich ein Unterschied zwischen nodal negativen und nodal positiven Patienten in Bezug auf das erkrankungsfreie Überleben. Die krankheitsfreie Lebenszeit der Patienten mit negativer Lymphknotenbeteiligung lag durchschnittlich bei 47,4 Monaten [KI: 38,8 – 55,0] und war bei positivem Lymphknotenstatus mit 43,0 Monaten [KI: 31,9 – 54,0] kürzer. Hier unterschieden sich in der Subanalyse die Zeiträume mit *pN1*-Status mit 47,2 Monaten [25,3 – 69,2] zum *pN2*-Status mit 39,9 Monaten [KI: 27,4 – 52,3] nur geringfügig voneinander ( $p=0.386$ ). Das 2-Jahres erkrankungsfreie Leben lag für *N-* bei 68,5%, während es für *N+* lediglich bei 59,0% lag. Für 5-Jahre wurden 58,1% und 43,4% festgestellt, ohne im Log-Rank Test ein signifikantes Niveau zu erreichen ( $p=0.199$  für *N-* vs. *N+*;  $p=0.160$  für *pN0* vs. *pN1* vs. *pN2*). [Siehe Abbildung 30].

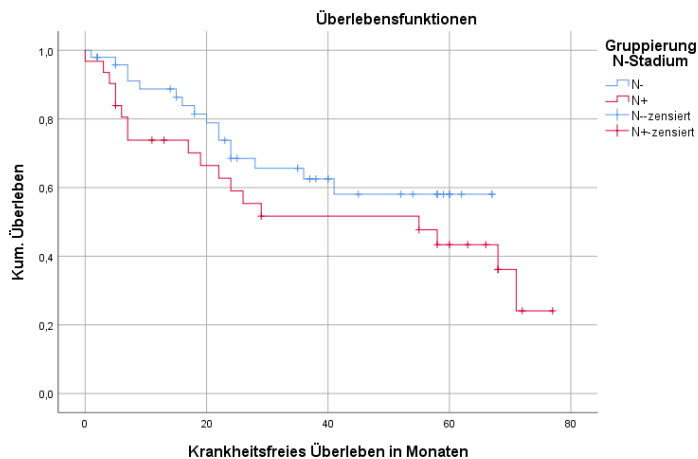


Abbildung 28: Erkrankungs-freies Überleben getrennt nach N-Stadium Gruppe

#### 4.4.4.4 UICC-Stadium

Das krankheitsfreie Überleben unterschied sich statistisch signifikant ( $p=0.027$ ) in Bezug auf die UICC-Stadieneinteilung *I/II* gegenüber *III/IV*. Die Entwicklung einer Erkrankungsdynamik wurde mit nur 29,7% in UICC-Stadien *I/II* seltener gegenüber 53,5% in Stadien *III/IV* beobachtet. In der Subanalyse aller UICC-Stadien zeigen Patienten im Stadium *IVa* eine Progredienz in 50,0% und im Stadium *IVb* sogar in 87,5% der Fälle ( $p=0.037$ ). Patienten der niedrigen UICC-Stadien *I/II* zeigten eine 2-Jahres krankheitsfreie Überlebensrate von 69,1% gegenüber Patienten der Stadien *III/IV* mit 61,1%. Diese Ergebnisse betragen für 5 Jahre 56,7% bzw. 46,5% ( $p=0.309$ ) und zeigten sich in der Subanalyse über alle UICC-Stadien hochsignifikant im Log-Rank Test ( $p=0.008$ ). [Siehe Abbildung 31].

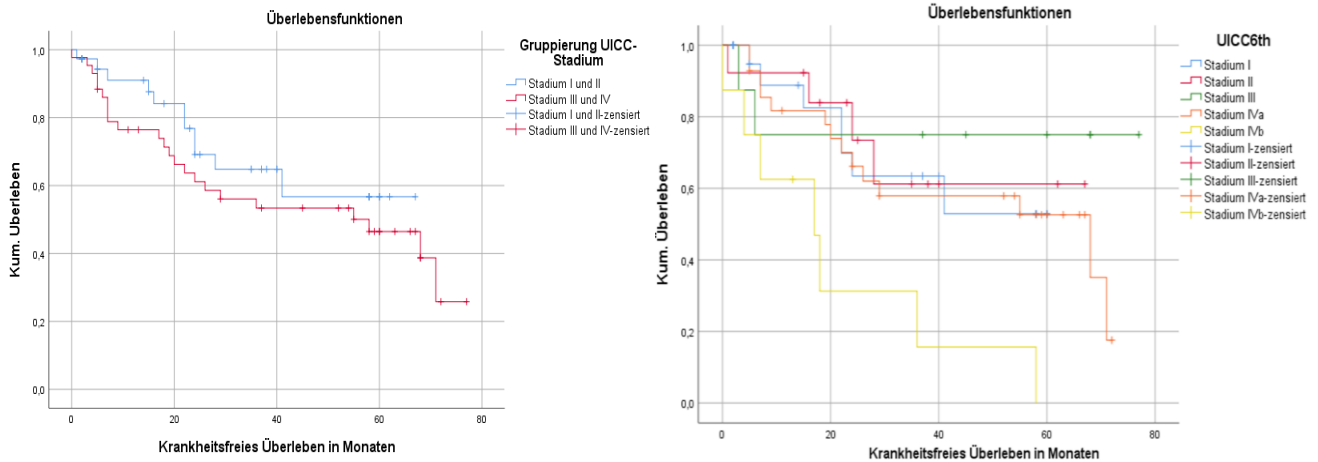


Abbildung 29: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach UICC-Stadium Gruppe (links) und UICC-Stadium (rechts)

#### 4.4.4.5 Extranodale Extension

Patienten mit negativem Nodalstatus hatten eine durchschnittliche erkrankungsfreie Lebenszeit von 47,4 Monaten [KI: 39,8 – 55,0]. Demgegenüber zeigten Patienten mit positivem Nodalstatus und fehlender extrakapsulärer Ausdehnung ( $N+/ece-$ ) ein durchschnittliches erkrankungsfreies Überleben von nur 40,2 Monaten [KI: 25,8 – 54,6] und Patienten mit positivem Nodalstatus und extrakapsulärer Tumorausdehnung ( $N+/ece+$ ) von 45,5 Monaten [KI: 28,9 - 62,0] ein kürzeres krankheitsfreies Intervall im Log-Rank-Test ( $p=0.326$ ).

Ohne Lymphknotenbefall erlitten 32,7% der Patienten ein Fortschreiten der Erkrankung. Innerhalb der Patientengruppe mit positivem Lymphknotenstatus zeigten Patienten mit extrakapsulärem Wachstum mit 53,8% seltener einen Progress als Patienten ohne extrakapsuläres Wachstum mit 61,1%. Dieser Unterschied zwischen  $N+/ece+$  und  $N+/ece-$  Tumorstatus zeigte sich jedoch nicht signifikant ( $p=0.484$ ). Über alle drei Gruppen hinweg zeigte sich dieser Unterschied statistisch knapp nicht signifikant ( $p=0.076$ ). Das 2-Jahres krankheitsfreie Überleben war bei Patienten ohne Lymphknotenbefall mit 73,8% höher als im Status  $N+/ece-$  mit 59,1% und  $N+/ece+$  mit 58,7% und belief sich für 5 Jahre auf 58,1%, 38,3% und 50,3%. [Siehe Abbildung 32].

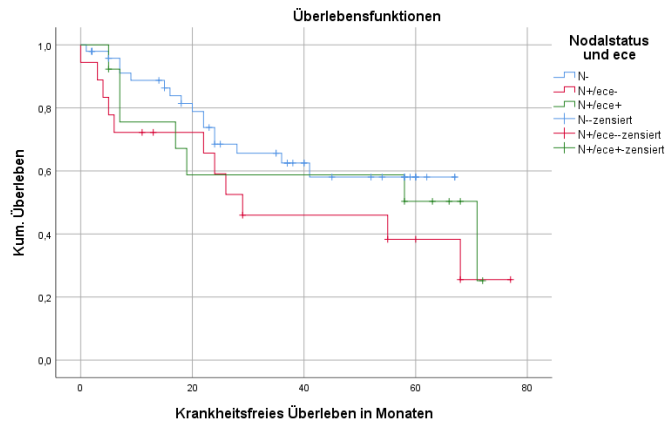


Abbildung 30: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Nodalstatus und Extranodalexension

#### 4.4.4.6 Lymphangiosis

Bei histopathologischem Vorliegen einer Lymphangiosis zeigten Patienten ein durchschnittliches krankheitsfreies Überleben von 42,0 Monaten [KI: 23,1 – 60,8] gegenüber Patienten ohne Lymphangiosis mit durchschnittlich 49,5 Monaten [KI: 41,8 – 57,2]. Patienten mit *L1*-Status entwickelten im Nachbeobachtungszeitraum in 58,3% der Fälle eine Erkrankungsdynamik, während dies bei lediglich 39,7% der Patienten mit *L0*-Status beobachtet wurde ( $p=0.187$ ). Diese Auswertung war im Log-Rank Test nicht signifikant ( $p=0.313$ ). Hierbei zeigte sich eine 2-Jahres Krankheitsfreie Überlebensrate von 70,0% im Stadium *L0* gegenüber 55,6% im Stadium *L1*, bzw. 53,2% und 41,7% über 5-Jahre. [Siehe Abbildung 33].

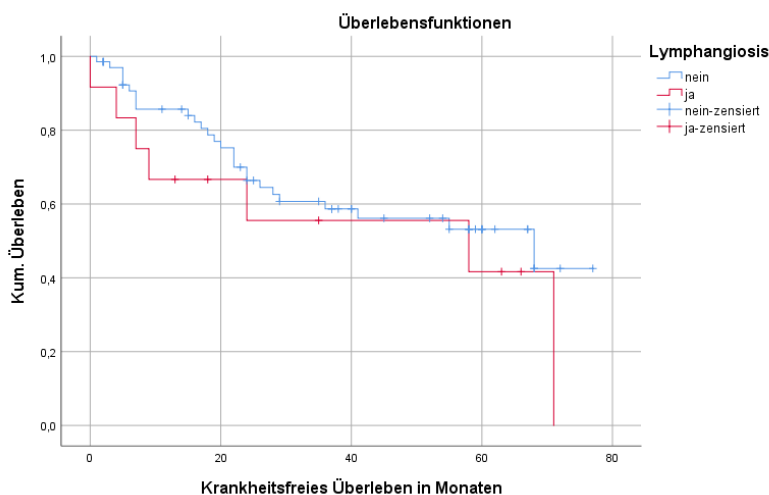


Abbildung 31: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Lymphangiosisstatus

#### 4.4.4.7 Resektionsrand

Obwohl Patienten mit vollständiger Resektion lediglich in 40,0% und Patienten mit unvollständiger Resektion in 53,3% einen Krankheitsprogress zeigten, konnte statistisch kein signifikanter Unterschied bezüglich der erkrankungsfreien Zeit beobachtet werden ( $p=0.256$ ). Patienten mit vollständiger Resektion hatten durchschnittlich ein 50,4-monatiges [KI: 42,9 – 57,9] erkrankungsfreies Überleben. Dieser Zeitraum betrug bei Vorliegen einer *R1*-Resektion lediglich 34,1 Monate [KI: 18,7 - 49,6].

Eine *R0*-Resektion zeigte ein verbessertes 2-Jahres krankheitsfreies Überleben von 70,2% gegenüber 40,9% bei *R1*-Status. Dieser Unterschied betrug 53,5% gegenüber 40,9% im 5-Jahres Intervall, ohne statistisch ein signifikantes Niveau zu erreichen ( $p=0.105$ ). [Siehe Abbildung 34].

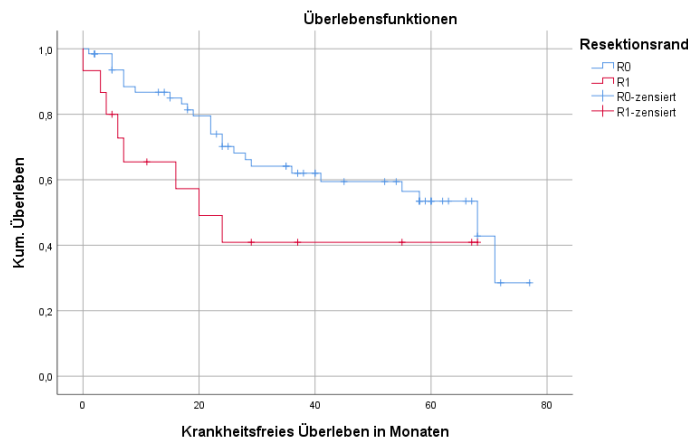


Abbildung 32: Erkrankungs-freies Überleben getrennt nach Resektionsstatus

#### 4.4.5 Adjuvante Therapie

Die durchschnittliche krankheitsfreie Überlebenszeit der Patienten unterschied sich zwischen den Gruppen *Keine Adjuvanz*, *Adjuvante Radiotherapie* und *Adjuvante kombinierte Radiochemotherapie* statistisch nicht voneinander.

Patienten, die keine adjuvante Therapie erhielten, zeigten einen Krankheitsprogress nach durchschnittlich 47,3 Monaten [KI: 35,7 – 59,0], Patienten mit alleiniger adjuvanter Radiotherapie nach 45,2 Monaten [KI: 34,2 – 56,0] und Patienten mit adjuvanter kombinierter Radiochemotherapie nach 46,6 Monaten [KI: 34,8 – 58,3].

Im Log-Rank Test zeigten sich diese Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant ( $p=0.997$ ). So lag das 2-Jahre krankheitsfreie Überleben ohne Adjuvanz bei 64,8%, während es bei alleiniger Radiotherapie bei 65,2% und kombinierter Radiochemotherapie bei 64,5% lag. Für den 5-Jahreszeitraum wurden 49,4%, 48,9% und 52,1% erreicht. [Siehe Abbildung 35].

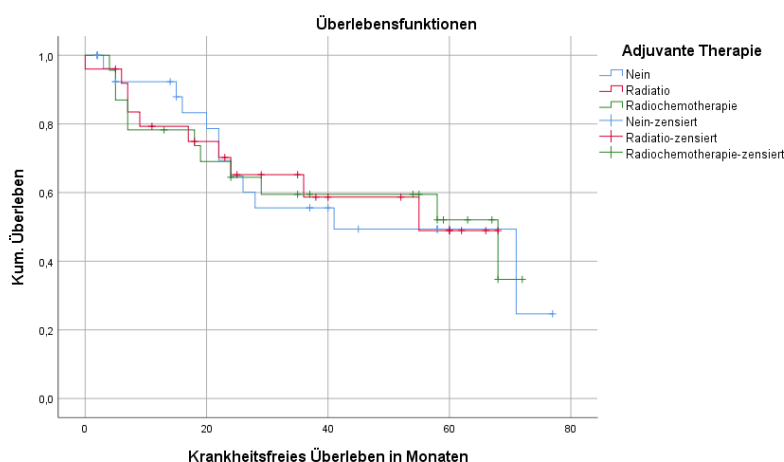


Abbildung 33: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Adjuvanzform

#### 4.4.6 Bestrahlungsdosis

In der Untersuchung zeigte sich statistisch kein Unterschied des krankheitsfreien Überlebens bezüglich der kumulierten radiotherapeutischen Gesamtreferenzdosis.

Patienten der niedrigen Bestrahlungsdosisgruppe von 50,4 bis 59,4 Gy zeigten ein krankheitsfreies Leben von durchschnittlich 43,9 Monaten [KI: 24,9 – 62,8]. Patienten, die eine Dosis von 59,4 Gy erhielten, zeigten ein durchschnittliches krankheitsfreies Überleben von 46,3 Monaten [KI: 35,2 - 57,4] und Patienten der Hochdosisgruppe mehr als 59,4 Gy von 41,4 Monaten [KI: 15,2 – 67,7]. Das 2-Jahre erkrankungsfreie Überleben der Niedrigdosisgruppe betrug 71,4%, während es bei Patienten der mittleren Dosisgruppe auf 63,2%, und innerhalb der Hochdosisgruppe auf 57,1% sank. Für den 5-Jahreszeitraum zeigten sich 71,4%, 46,2% und 57,1%. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ( $p=0.816$ ). [Siehe Abbildung 36].

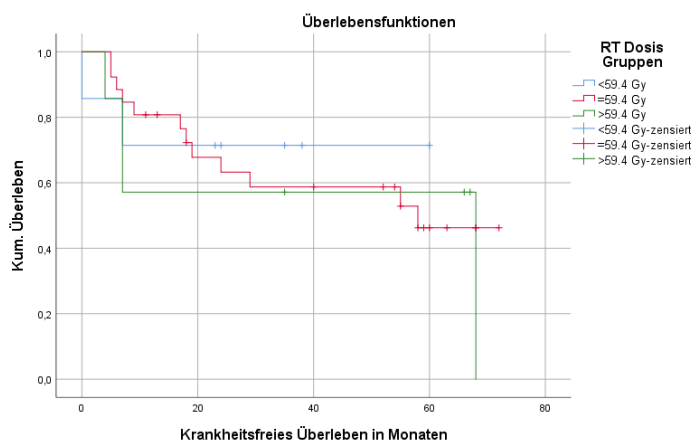


Abbildung 34: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Bestrahlungsdosis (RT-Dosis)

## 4.4.7 Molekularpathologische Untersuchungen

### 4.4.7.1 EGFR

Obwohl Patienten mit steigendem EGFR-Expressionsgrad ein kürzeres krankheitsfreies Überleben aufwiesen, waren die Unterschiede innerhalb der Gruppen statistisch nicht signifikant ( $p=0.332$ ) zueinander. Allerdings zeigten nur 7,5% der Patienten ohne EGFR-Expression einen Progress, während dies bei 42,9%, 56,3% und 46,4% mit steigendem Expressionsgrad beobachtet wurde. Patienten ohne EGFR-Expression besaßen das längste erkrankungsfreie Überleben von durchschnittlich 55,7 Monaten [KI: 43,0 – 68,4], mit schwacher Expression von 49,7 Monaten [KI: 33,8 – 65,6], moderater Expression von 41,5 Monaten [KI: 29,0 – 54,0] und starker Expression von lediglich 41,7 Monaten [KI: 30,0 – 53,4]. Im Log-Rank Test zeigte sich dieser Unterschied zwischen den Gruppen dennoch nicht signifikant ( $p=0.454$ ). Das 2-Jahre krankheitsfreie Überleben betrug bei fehlender EGFR-Expression 78,2%, bei schwacher Expression 75,2%, bei moderater Expression 60,6% und bei starker Expression 52,3%. Für 5-Jahre wurden 71,7%, 54,8%, 35,9% und 47,1% beobachtet. [Siehe Abbildung 37].

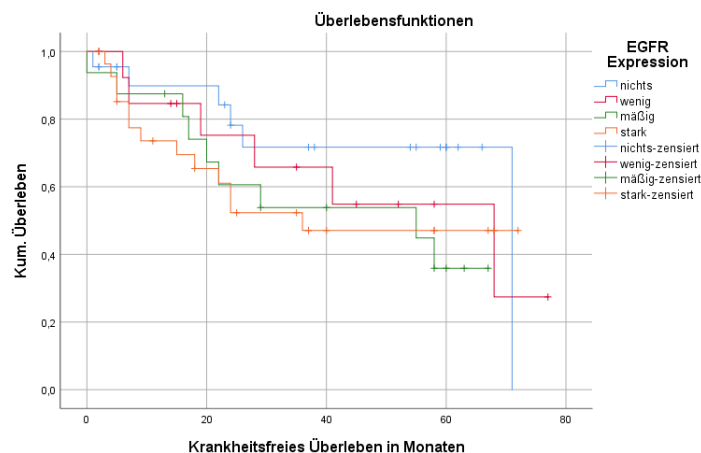


Abbildung 35: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach EGFR-Expression

### 4.4.7.2 VEGF

Das krankheitsfreie Überleben der Patienten unterschied sich innerhalb der Gruppen nach histopathologischem Grad der Expression von VEGF2 statistisch nicht voneinander ( $p=0.172$ ). Dennoch zeigten Patienten mit starker Expression zu 100% einen Erkrankungsprogress. Demgegenüber wurden Erkrankungsprogresses bei fehlender (54,5%), schwacher (38,1%) oder moderater (37,5%) VEGF-Expression seltener beobachtet. Patienten ohne VEGF-Expression zeigten ein erkrankungsfreies Überleben von durchschnittlich 36,7 Monaten [KI: 24,5 – 48,9], mit schwacher Expression von 50,4 Monaten [KI: 40,4 – 60,5], moderater Expression von 45,8



Monaten [KI: 34,6 – 56,9] und starker Expression von 34,7 Monaten [KI: 0 – 71,3]. Im Log-Rank Test zeigten sich diese Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant ( $p=0.608$ ).

Das 2-Jahre krankheitsfreie Überleben lag bei fehlender VEGF-Expression bei 57,1% mit schwacher Expression bei 68,5%, moderater Expression bei 65,7% und starker Expression bei 33,3%. Für den 5-Jahres Beobachtungszeitraum wurden 19,0%, 57,2%, 55,1% und 33,3% beobachtet. [Siehe Abbildung 38].

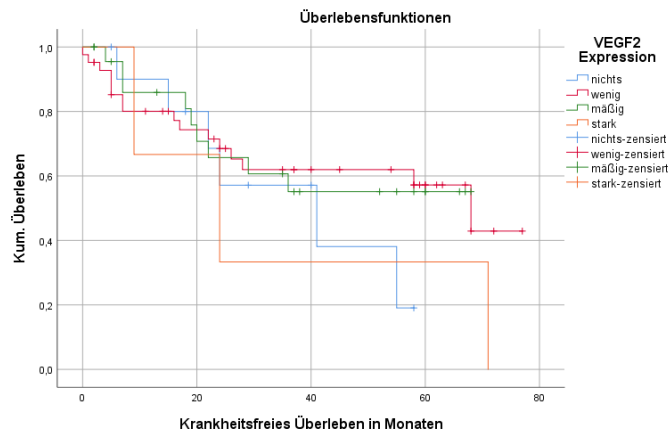


Abbildung 36: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach VEGF2-Expression

#### 4.4.7.3 Moesin

Das krankheitsfreie Überleben der Patienten zeigte innerhalb der Gruppen nach histopathologischem Grad der Expression von Moesin statistisch einen signifikanten Unterschied zueinander ( $p=0.023$ ). Während kein Patient (0%) ohne Expression von Moesin einen Krankheitsprogress erlitt, zeigten 33,3% der schwach und 26,1% der Patienten mit moderater Expression einen Progress. Daneben erlitten 64,0% der Patienten mit starker Expression ein Fortschreiten der Erkrankung. Das 2-Jahre krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit fehlender Expression betrug entsprechend 100%, mit schwacher Expression 73,3%, moderater Expression 73,0% und starker Expression 57,8%, bzw. 100%, 58,7%, 62,6% und 38,5% für 5 Jahre. [Siehe Abbildung 39].

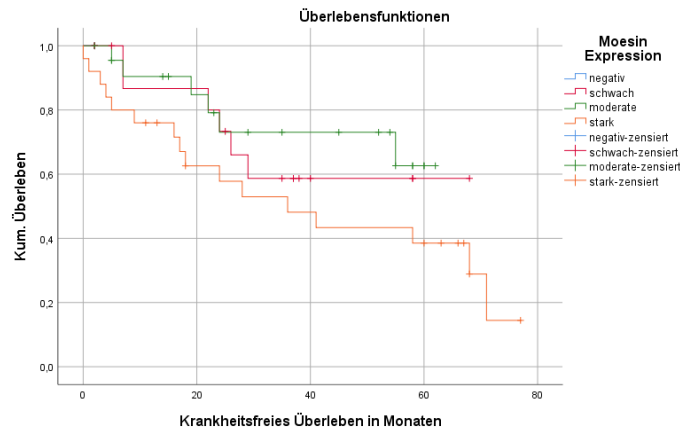


Abbildung 37: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Moesin-Expression

#### 4.4.7.4 PKM2

Das krankheitsfreie Überleben der Patienten unterschied sich innerhalb der Gruppen nach histopathologischem Grad der Expression von PKM2 statistisch nicht voneinander ( $p=0.820$ ). Dennoch zeigten Patienten mit starker Expression einen Progress in 55,6% der Fälle, während die Patienten mit fehlendem (33,3%), schwachem (36,4%) und moderatem (39,4%) Expressionsgrad seltener einen Krankheitsprogress erlitten. Patienten ohne PKM2-Expression hatten eine durchschnittliche erkrankungsfreie Lebenszeit von 41,9 Monaten [KI: 25,2 - 58,6], mit schwacher Expression von 51,5 Monaten [KI: 39,4 – 63,6], moderater Expression von 53,1 Monaten [KI: 43,4 – 62,9] und starker Expression von 30,2 Monaten [KI: 12,1 – 48,3].

Im Log-Rank Test zeigten sich diese Gruppenunterschiede nicht signifikant ( $p=0.255$ ).

Das 2-Jahre krankheitsfreie Überleben betrug bei fehlender PKM2-Expression 63,5%, bei schwacher Expression 71,9%, bei moderater Expression 77,2% und bei starker Expression 38,1%. Für das 5-Jahre krankheitsfreie Überleben wurden 63,5%, 56,0%, 55,9% und 38,1% notiert. [Siehe Abbildung 40].

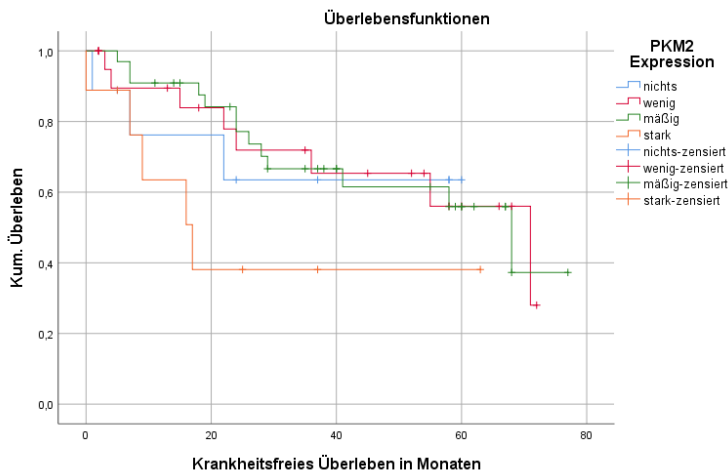


Abbildung 38: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach PKM2-Expression

#### 4.4.7.5 COX-2

Das krankheitsfreie Überleben der Patienten unterschied sich innerhalb der Gruppen nach histopathologischem Grad der Expression von COX-2 statistisch nicht voneinander ( $p=0.890$ ). Patienten ohne COX-2-Expression zeigten ein erkrankungsfreies Überleben von durchschnittlich 47,7 Monaten [KI: 32,6 – 62,7], bei schwacher Expression von 41,0 Monaten [KI: 29,9 – 52,1], bei moderater Expression von 50,1 Monaten [KI: 38,8 – 61,4] und bei starker Expression von 46,5 Monaten [KI: 27,6 – 65,4].

Im Log-Rank Test erwiesen sich die Ergebnisse zwischen den Gruppen als nicht signifikant zueinander ( $p=0.911$ ). Das 2-Jahres krankheitsfreie Überleben lag bei fehlender COX-2-Expression bei 65,5%, bei schwacher Expression bei 50,0%, bei moderater Expression bei 74,3% und bei starker Expression bei 70,0%. Das 5-Jahres krankheitsfreie Überleben betrug 57,3%, 50,0%, 48,0% und 60,0%. [Siehe Abbildung 41].

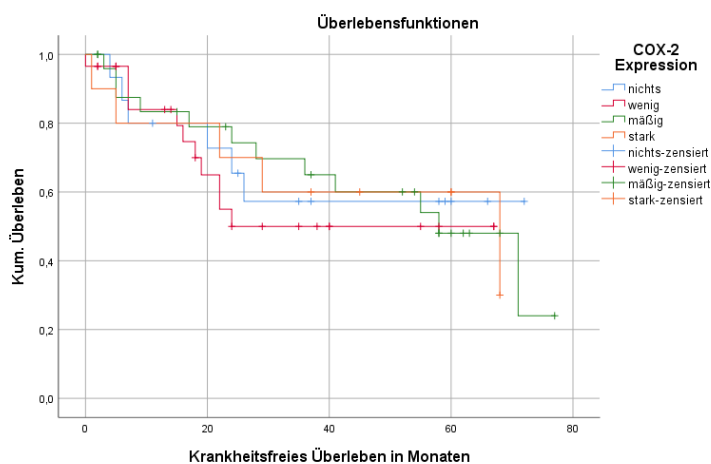


Abbildung 39: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach COX-2-Expression

#### 4.4.7.6 Podoplanin

Patienten ohne Podoplanin-Expression zeigten in lediglich 23,1% der Fälle einen Progress und stieg mit schwacher Expression auf 33,3%, bei mäßiger Expression auf 40,0% und bei Vorliegen einer starken Expression auf 68,4% an ( $p=0.054$ ).

Dieser Zusammenhang zwischen Progress und steigender Podoplanin-Expression zeigte sich im Log-Rank Test hoch signifikant ( $p=0.027$ ). Patienten ohne Podoplanin-Expression zeigten ein erkrankungsfreies Überleben von durchschnittlich 44,3 Monaten [KI: 30,6-57,9], mit schwacher Expression von 47,2 Monaten [KI: 33,9 – 60,4], mit moderater Expression von 54,1 Monaten [KI: 44,2 – 64,1] und bei starker Expression von 29,5 Monaten [KI: 16,8 - 42.2]. Das 2-Jahres krankheitsfreie Überleben lag bei fehlender Podoplanin-Expression bei 63,0%, schwacher Expression bei 67,2%, moderater Expression bei 75,9% und starker Expression bei 40,8%. Das 5-Jahres krankheitsfreie Überleben betrug 63,0%, 60,5%, 55,9% und 27,2%. [Siehe Abbildung 42].

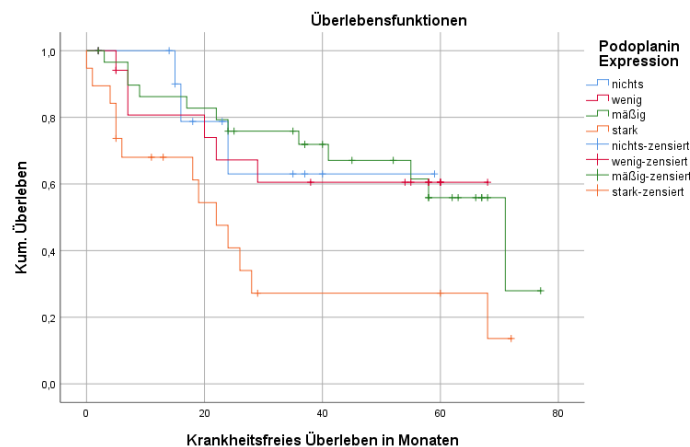


Abbildung 40: Erkrankungs-freies Überleben getrennt nach Podoplanin-Expression

#### 4.4.7.7 SMR3A

Mit steigendem SMR3A-Expressionsgrad stieg auch die Wahrscheinlichkeit eines Krankheitsereignisses bei verkürzten krankheitsfreien Überlebenszeiten. Patienten ohne SMR3A-Expression zeigten in lediglich 14,3% der Fälle eine Erkrankungsdynamik, während dies bei schwacher Expression in 33,3%, bei mäßiger Expression in 40,0% und bei Vorliegen einer starken Expression in 57,1% festgestellt wurde ( $p=0.462$ ).

Das krankheitsfreie Überleben von Patienten ohne SMR3A betrug durchschnittlich 63,0 Monate [KI: 38,5 – 87,6], mit schwacher Expression 53,1 Monate [KI: 38,3 – 67,9], moderater Expression 36,3 Monate [KI: 5,1 – 67,4] und starker Expression lediglich 35,0 Monate [KI: 17,4 - 52.6].

Das 2-Jahre krankheitsfreie Überleben wurde bei fehlender SMR3A-Expression mit 80,0%, bei schwacher Expression mit 76,2% beobachtet. Bei moderater Expression sank das 2-Jahre krankheitsfreie Überleben auf 50,0% und reduzierte sich bei starker Expression weiter auf 33,3%. Das 5-Jahre krankheitsfreie Überleben betrug bei fehlender SMR3A-Expression 80,0%, bei schwacher Expression 57,1%, moderater Expression 50,0% und starker Expression bei 33,3%. Dennoch konnte im Log-Rank Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden ( $p=0.586$ ). [Siehe Abbildung 43].

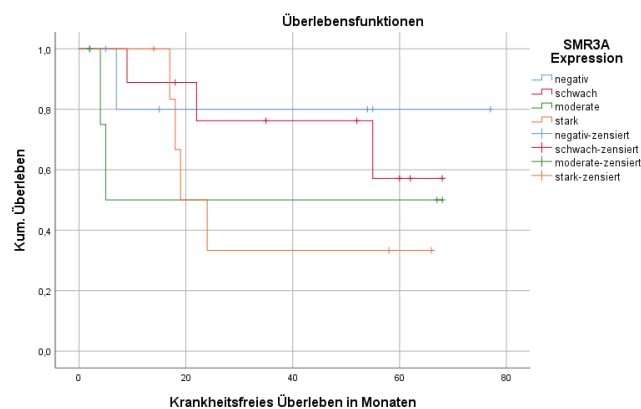


Abbildung 41: Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach SMR3A-Expression

#### 4.4.8 Multiple Lineare Regressionsanalyse

Vier prognostisch relevante Parameter, die sich in der univariaten Untersuchung des erkrankungsfreien Überlebens signifikant zeigten, konnten für eine Multiple Lineare Regressionsanalyse definiert werden.

Die Parameter waren: *Geschlecht, UICC-Stadium, Moesin- und Podoplanin-Expressionsgrad.*

Als unabhängige prognostische Parameter verfehlten *Geschlecht* ( $p=0.079$ ), *Moesin* ( $p=0.116$ ) und *Podoplanin* ( $p=0.101$ ) statistisch knapp einen statistischen Einfluss.

Parameter für die Multivariaten Cox Proportional Hazard Modelle waren *Geschlecht* (männlich vs. weiblich), *UICC-Stadium* (I/II vs. III/IV). *Moesin*-Expressionsgrad (negativ/ schwach/ moderat/ stark) und *Podoplanin*-Expressionsgrad (negativ/ schwach/ moderat/ stark).

Tabelle 11 zeigt eine Übersicht der Variablen.

Tabelle 11: Multiple Lineare Regressionanalyse für den Endpunkt Erkrankungsfreies Überleben

Einflussvariable	Signifikanz	95.0% Konfidenzintervall	
		Untergrenze	Obergrenze
Geschlecht	0.079	-0.026	0.462
UICC-Stadium	0.696	-0.229	0.340
Moesin	0.116	-0.030	0.267
Podoplanin	0.101	-0.023	0.250

## 5 Diskussion

### 5.1 Einführung in die Diskussion

In westlichen Industrienationen ist die Exposition gegenüber Nikotin- und Alkoholkonsum rückläufig. Gleichzeitig nimmt die Inzidenz von Kopf-Hals-Karzinomen ab [120].

Allerdings steigt die Prävalenz primärer Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome insbesondere bei einer Subpopulation jüngerer Patienten [49].

Im Jahr 2018 wurden in Deutschland insgesamt 9.450 Männer und 5.700 Frauen mit bösartigen Erkrankungen der Mundhöhle und des Rachens erstdiagnostiziert [143].

Hierbei weisen Männer mit 40% als häufigste Lokalisation Tumoren des Oropharynx auf, gefolgt von der Mundhöhle und Lippe mit 35%; die Primärlokalisationen bei Frauen befinden sich zu 46% in der Mundhöhle und an der Lippe und zu 33% im Oropharynx [143].

In Deutschland berichtet das Robert-Koch-Institut für Kopf-Hals-Karzinome im Jahr 2018 ein medianes Erkrankungsalter von 63 Jahren bei Männern und von 65 Jahren bei Frauen [55]. In der vorliegenden Untersuchung ist das mediane Erkrankungsalter mit 60 und 65 Jahren vergleichbar und resultiert für die Gesamtkohorte in einem Medianalter von 61,8 Jahren.

### 5.2 Therapieoptionen bei fortgeschrittenen Stadien

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden Patienten mit lokal begrenzten und lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle eingeschlossen.

Die Therapieintention war kurativ und bei keinem Patienten gab es klinisch einen Hinweis auf das Vorliegen einer distanten Metastasierung. Die Patienteneinteilung nach UICC-Stadien zeigte in 10% ein Stadium III, in 35% Stadium IVa und in 10% ein Stadium IVb, sodass insgesamt lediglich 45% des Kollektivs den niedrigen Stadien I (28,7%) und II (16,3%) zugeordnet werden können.

Für niedrige Tumorstadien sind die Ergebnisse einer alleinigen Radiotherapie und Radiochemotherapie im Vergleich zur primären Resektion gleichwertig in Bezug auf die lokale Kontrolle [103]. Bei fortgeschrittenen Karzinomen zeigen sich peri- und postoperativ häufig Risikofaktoren, die histopathologisch zu einem Upstaging der initialen klinischen Ergebnisse führen und damit eine adjuvante Behandlung erforderlich machen können. Das frühzeitige Erkennen dieser histopathologischen Risikofaktoren im Rahmen des prätherapeutischen Stagings könnte dabei helfen die Primärbehandlung zu stratifizieren und Kurationsraten entscheidend zu verbessern.

Rogders et al. konnten bereits 1993 zeigen, dass nach alleiniger Radiotherapie bei fortgeschrittenen Mundhöhlenkarzinomen die lokale Kontrolle im Vergleich zu Salvage Behandlungen verringert ist [103]. Die Behandlung fortgeschrittener Tumoren weist durch multimodale Therapiekonzepte verbesserte Langzeitergebnisse bezüglich der lokalen Kontrolle, des erkrankungsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens auf [103] und gilt als Grundlage moderner Therapiekonzepte.

In fortgeschrittenen Stadien sollte, sofern es der Allgemeinzustand des Patienten erlaubt, im primär kurativen Setting, soweit technisch und funktionell möglich, eine operative Versorgung mit risikoadjustiert adjuvanter Radiotherapie oder Radiochemotherapie erfolgen [13, 96, 149]. Als chirurgische Therapielimitationen gelten insbesondere anatomische Begrenzungen und Lokalisation des Primärtumors, die eine Resektion mit Sicherheitsabstand aufgrund der funktionellen Grenzen und engen Lagebeziehungen einschränken können [75].

Durch angrenzende Lagebeziehungen zu Risikostrukturen steigt die Gefahr für unvollständige Resektionen. So berichten Kokemueller et al. insbesondere für vermehrte positive Lymphknoten und Lymphknotenkonglomerate mit Affektion der Arteria carotis oder der Schädelbasis einen negativen prognostischen Wert [57].

Im vorliegenden Kollektiv zeigen sich herausfordernde topographische Lagebeziehungen zu anatomisch sensiblen Strukturen bedingt durch die Primärlokalisationen der Tumoren, die in 43,8% im Bereich des Mundbodens, 22,5% der Zunge, 17,5% des Unterkiefers, 10,0% der Wange und 6,3% des Oberkiefers und harten Gaumens notiert werden.

### **5.2.1 Histopathologische Risikofaktoren**

Als Risikofaktoren mit Notwendigkeit zur individuellen Diskussion einer adjuvanten Therapie mittels Radiatio oder Radiochemotherapie definiert das National Comprehensive Cancer Network (NCCN) das Vorliegen einer extranodalen Extension, R1- / R2-Resektion oder knappe Resektionsränder, pT3 oder pT4, pN2 oder pN3, Lymphknoten in den zervikalen Abflussleveln IV oder V, Perineuralscheideninfiltration, Gefäßinvasion oder Lymphangiosis [75, 89].

Die deutsche S3-Leitlinie empfiehlt die postoperative simultane Radiochemotherapie bei Vorliegen einer R1- oder R2-Situation oder extranodaler Extension [8]. Diese Empfehlungen waren Grundlage der adjuvanten Triagierung des vorliegenden Kollektivs nach Tumorboard-Diskussion unter Berücksichtigung patientenindividueller Faktoren bezüglich der Systemtherapiefähigkeit und Dosislimitation im Rahmen der radioonkologischen Beurteilung.

Obwohl im Kollektiv bei 55% der Patienten ein UICC Stadium III oder IV vorliegt, konnte die operative Behandlung in 81,2% der Fälle ohne histopathologischen Nachweis von Tumorresiduen als *R0*-Resektion erfolgen und als *R1*-Resektion in 18,8% der Fälle.

Weckx et. al berichten, dass durch unvollständige Resektion das Auftreten von Frührezidiven bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle signifikant häufiger beobachtet wird ( $p=0.001$ ) und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist ( $p<0.001$ ) [139]. Daneben können Frührezidive bei extranodaler Extension ( $p<0.001$ ) und höherem Grading ( $p=0.003$ ) des Primärtumors gehäuft beobachtet werden [139]. Vergleichbar zum vorliegenden Kollektiv sind Resektionen in Zentren mit hoher chirurgischer Aktivität erfolgreicher und zeigen bessere funktionelle Ergebnisse [37]. Löffstrand et al. vermuten, dass dieser Effekt durch Fortschritte der mikrochirurgischen Anastomosierung von Transplantatgeweben und komplikationsärmeren mikrovaskulären Lappen – Operationen hervorgerufen wird [70]. Diese Operationsverfahren wurden auch im vorliegenden Kollektiv verwendet und erklären die gesteigerte Rate an *R0* Resektibilität, die in anderen Institutionen mit 56-84% berichtet wird [131].

Neben der *R0* und *R1* Resektion definiert die NCCN anhand der Distanz zwischen der Tumorinvasionsfront und der gesunden Mukosa oder tiefen Absetzungsrändern im Formalinfixierten Präparat eine clear margin ( $>5\text{mm}$  Resektionsrand), close margin (1-5mm) und positive margin ( $<1\text{mm}$ ) [89]. Diese Unterscheidung ist im vorliegenden Kollektiv nicht erfolgt. Es gibt Hinweise auf divergente Raten an lokalen Rezidiven für Patienten mit close margin gegenüber clear margin Resektionen [131]. Tasche et al. berichten von einer Lokalrezidivrate von 28% bei positiver und 17% bei close margin Resektion trotz multimodaler adjuvanter Therapien inklusive Re-Resektion [81, 127].

Im hier vorliegenden Kollektiv zeigt der unvollständige Resektionsstatus eine Assoziation mit Lymphknotenmetastasierung ( $p=0.050$ ) ohne mit extranodaler Extension ( $p=0.165$ ), höherem UICC-Stadium ( $p=0.057$ ) oder HPV-Status ( $p=0.269$ ) assoziiert zu sein. Das Vorliegen einer *R1*-Resektion zeigt eine signifikante Korrelation mit der Entwicklung von Lokalrezidiven ( $p<0.001$ ) und höherem Grading ( $p=0.047$ ). Ein unvollständiger Resektionsstatus ist knapp nicht mit der Einleitung einer adjuvanten Therapie ( $p=0.081$ ) und höherer Bestrahlungsdosis ( $p=0.191$ ), Podoplanin-Expression ( $p=0.107$ ) und Tod ( $p=0.130$ ) assoziiert. Für die Expression von SMR3A zeigt sich in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation mit dem Resektionsstatus ( $p=0.607$ ). Dennoch scheint SMR3A trotz operativer Behandlung und adjuvanter Therapie ein möglicher unabhängiger Risikofaktor für Therapieversagen zu sein.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen einen signifikanten Einfluss von *T*- ( $p=0.028$ ), *N*- ( $p=0.015$ ) und UICC-Stadium ( $p=0.014$ ), extranodaler Extension ( $p=0.041$ ), sowie Lymphangiosis ( $p=0.004$ ) auf das Gesamtüberleben von Patienten und unterstützen damit die Risikofaktor Betrachtung



der NCCN unabhängig der im Kollektiv erfolgten Risikoadjustierten adjuvanten Behandlung [89]. Im Stadium IVa wird eine bessere 5-Jahres-Überlebensrate von 42,8% gegenüber Stadium IVb mit 25% (**p=0.003**) beobachtet. Diese Auswertungen können die Ergebnisse von Kreppel et al. bestätigen und zeigen für Hochrisikopatienten die Notwendigkeit zur Detektion und Selektion, welche Patienten von der Kombination einer adjuvanten Radio- und Radiochemotherapie profitieren könnten [60].

### 5.2.2 Lymphangiosis und Lymphknotenbefall

Trotz klinisch unauffälliger ipsilateraler Lymphabflusswege zeigt sich perioperativ in 5 bis 11% der Tumoroperationen kontralateral ein histopathologischer Nachweis okkultter Metastasen [58]. Berger et al. berichten isilateral von einer Lymphknotenmetastasierung in bis zu 41% der Fälle [12]. Es ist daher relevant vorherzusagen, welche Patienten trotz negativer klinischer Stagingbefunde ein erhöhtes Risiko okkultter Lymphgefäßinvasion oder lymphonodulärer Infiltration besitzen, da neben steigendem Grad der Dysplasie und des T-Stadiums insbesondere die Größe, sowie Anzahl von Lymphknotenmetastasen und beteiligter Lymphabflusslevel einen negativen prognostischen Wert besitzen [75]. Die S3-Leitlinie empfiehlt die Kriterien der histologischen Auswertung in Bezug auf „die Prognose des Mundhöhlenkarzinoms [...] mit Tumorlokalisation, makroskopischer Tumorgöße, Tumorgrading, Lymph- und Blutgefäßinvasion, perineurale Invasion, lokal infiltrierte Strukturen, Tumorstadium, lokaler Ausdehnung und Resektionsstatus“ [8]. Bei vorliegender Lymphgefäßinvasion kann ein erhöhtes Risiko an Lymphknotenmetastasierungen detektiert werden, sodass eine adjuvante Radiotherapie die Kurationsrate signifikant erhöhen kann [86]. Das Vorliegen einer Lymphgefäßinvasion gilt weiterhin als Risiko für extranodale Extension, große impaktierte Tumoren und kann das Risiko für distante Metastasierung erhöhen sowie die Überlebensprognose verringern [65].

Der Lymphangiosisstatus korreliert im vorliegenden Kollektiv signifikant mit der Einleitung einer adjuvanten Therapie (**p=0.023**). Diese erfolgt in 91,7% der Fälle mit *L1*-Status. Trotz adjuvanter Behandlung versterben im Nachbeobachtungszeitraum 75% der Patienten mit *L1*-Status und damit signifikant häufiger als die Patienten mit *L0*-Status, von denen lediglich 29,4% versterben (**p=0.007**). Das Vorliegen einer Lymphangiosis ist hochsignifikant mit verringertem 2- und 5-Jahres-Überleben assoziiert und beträgt 48,6% und 36,5% gegen 83,9% und 69,9% (**p=0.004**).

Die Neck-Dissection erfolgte im vorliegenden Kollektiv bilateral. Die Einleitung einer adjuvanten Therapie, als Radiotherapie oder Radiochemotherapie ist hochsignifikant mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen assoziiert ( $p=0.000$ ). Diese zeigen sich bei 38,7% der Patienten, wobei sie bei Männern signifikant häufiger auftreten ( $p=0.017$ ). Insgesamt erfolgte bei 87,1% der nodal positiven Patienten eine Nachbehandlung. Demgegenüber erfolgte lediglich bei 42,9% der nodal negativen Patienten eine Adjuvanz. Insbesondere bei Vorliegen eines Kapseldurchbruchs, der bei 41,9% der nodal positiven Tumoren nachweisbar ist, erhielten 92,3% der Patienten eine adjuvante Behandlung im Vergleich zu nur 53,7% der Patienten ohne Kapseldurchbruch ( $p=0.012$ ). Hierbei zeigt sich das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen sowie deren Unterscheidung nach extrakapsulärer Extension am stärksten mit Podoplanin assoziiert ( $p<0.001$ ). Weiterhin zeigt sich hierbei das Vorliegen einer Invasion in das Lymphgefäßsystem ( $p=0.002$ ), hoher Moesin-Expression ( $p=0.002$ ), höherem UICC-Stadium ( $p<0.001$ ) sowie T-Stadium ( $p<0.001$ ) prädiktiv für Lymphknotenmetastasierung. HPV-positive Tumoren ( $p=0.201$ ) und SMR3A-Expression ( $p=0.511$ ) zeigen keine Assoziation. Koo et al. berichten, dass Patienten mit Lymphknotenmetastasen eine signifikant geringere 5-Jahres erkrankungsspezifische Überlebensrate von 43% gegen 79% ( $p<0.05$ ) besitzen [58]. Im vorliegenden Kollektiv zeigt sich ein vergleichbarer Trend und Lymphknotenmetastasierung korreliert hoch signifikant mit tumorassoziertem Tod ( $p=0.005$ ). Patienten ohne Lymphknotenbeteiligung leben mit durchschnittlich 56,4 Monaten [KI: 50,6 – 62,3] länger als Patienten mit Lymphknotenbefall mit 43,4 Monaten [KI: 33,0 – 53,8]. Trotz erfolgter adjuvanter Therapie zeigt sich bei Nachweis einer Tumordinfiltration in lokoregionäre Lymphknoten ein statistisch signifikant kürzeres Gesamtüberleben ( $p=0.015$ ), wobei Patienten mit  $pN1$ -Status länger leben als Patienten mit  $pN2$ -Status ( $p=0.014$ ).

Das 2-Jahres-Überleben liegt im Stadium  $pN0$  bei 90,1%, während es bei positivem Lymphknotenstatus lediglich 61,3% beträgt. Der  $pN1$ -Status unterscheidet sich mit 66,7% zum  $pN2$ -Status mit 59,1% Überlebensrate geringfügig. Das 5-Jahres-Überleben wird im  $pN0$  Stadium mit 76,2% gegenüber 48,5% im Falle eines Stadium  $pN+$  festgestellt. Hier ist das Überleben im Stadium  $pN1$  mit 55,6% gegenüber 45,5% im Stadium  $pN2$  verbessert.

Für das erkrankungsspezifische Überleben wird der statistisch signifikante Unterschied im Vergleich von  $pN0$ ,  $pN+/ece+$  und  $pN+/ece-$  Tumoren knapp verfehlt ( $p=0.076$ ). Das 5-Jahres krankheitsfreie Überleben ist bei Patienten mit negativem Lymphknotenstatus mit 58,1% höher als bei  $pN+/ece-$  Patienten mit 38,3% und  $pN+/ece+$  Status mit 50,3%. Die Durchführung einer Hochdosis-Adjuvanz bei vorliegender extranodaler Extension könnte für das erkrankungsfreie Überleben prognostisch relevant sein und könnte negative histopathologische Ergebnisse möglicherweise ausgleichen.

### 5.2.3 Adjuvante Therapie

Die adjuvante Therapie erfolgte risikoadjustiert nach radioonkologischer Indikationsstellung analog des postoperativen Tumorboardbeschlusses und folgte den Empfehlungen der S3-Leitlinie unter Beachtung der NCCN Guidelines [8, 89]. Auf eine Adjuvanz konnte bei 38,5% der Patienten verzichtet werden, während 32,0% mittels alleiniger Radiatio und 29,5% per kombinierter Radiochemotherapie behandelt wurden.

Die Einleitung der Adjuvanz zeigt sich im vorliegenden Kollektiv hoch signifikant mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen assoziiert ( $p=0.000$ ). So erhielten 87,1% Patienten mit Lymphknotenmetastasen doppelt so häufig eine Adjuvanz gegenüber 42,9% der Patienten ohne Lymphknotenmetastasen. Daneben zeigt sich in der Stratifizierung nach extranodaler Extension ein signifikanter Unterschied mit 92,3% bei Vorliegen und 53,7% ohne Vorliegen von extrakapsulärem Wachstum im Falle positiver Lymphknoten ( $p=0.012$ ). Auch Lymphgefäßinvasion ( $p=0.023$ ), fortgeschrittenes UICC-Stadium ( $p<0.001$ ) und höhergradiges T-Stadium ( $p<0.001$ ) korrelieren mit adjuvanter Behandlung. Die adjuvante Therapieeinleitung ist dabei am stärksten assoziiert mit hoher Expression von Podoplanin ( $p<0.001$ ) und Moesin ( $p=0.002$ ). Diese Ergebnisse bestärken die Annahme, dass biomolekulare Faktoren im Rahmen der Behandlungsplanung bei Mundhöhlenkarzinomen prädiktiv eingesetzt werden könnten.

Die Radiotherapiekonturierung erfolgte bilateral entsprechend der Empfehlungen nach Clinical Target Volume Definition analog Grégoire et al. [45].

Die Radiotherapiedosis ist mit Median 59,4 Gy vergleichbar zu der Dosis der US-amerikanischen Radiation Therapy Oncology Group (RTOG)-9501, bei der Median 60 Gy GRD appliziert wurden [26], und der European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)-22931, mit Median 66 Gy GRD [14]. Insgesamt wurde in unserer Untersuchung bei 82,5% der Patienten eine Radiatio im Behandlungskonzept mit 59,4 Gy GRD oder mehr durchgeführt. Allerdings muss einschränkend berücksichtigt werden, dass die Wahl der Therapiedosis möglicherweise Einflüsse einer Therapiestratifizierung nach Risikoprofil zeigt. So zeigt sich im vorliegenden Kollektiv kein Nachweis signifikanter Einflüsse der Therapiedosis auf das erkrankungsfreie Überleben ( $p=0.816$ ) und das Gesamtüberleben ( $p=0.485$ ). Es kann vermutet werden, dass durch die Wahl des Radiotherapiedosiskonzeptes initiale Risikofaktoren und die onkologische Prognose erfolgreich ausgeglichen werden kann. Die postoperative Radiotherapie mit einer GRD > 60 Gy kann die lokale Tumorkontrolle trotz close margin oder positive margin verbessern [150]. Eine kumulierte Hochdosis GRD wird im vorliegenden Patientenkollektiv gehäuft bei postoperativem Risikoprofil eingeleitet und ist mit schlechter Prognose assoziiert. Patienten der Niedrigdosisgruppe <59,4 Gy leben am längsten. Diese zeigen ein 5-Jahres-Überleben von 85,7% gegenüber 52,9% bei mittlerer Dosis von 59,4 Gy und lediglich 35,7% bei hoher Dosis >59,4 Gy.

Eine adjuvante Behandlung wurde in 61,6% der Fälle durchgeführt, wovon 64,5% männliche und 35,7% weibliche Patienten waren. Innerhalb der Geschlechtergruppen erhielten 60,8% der männlichen Patienten und 58,6% der weiblichen Patienten eine adjuvante Therapie ( $p=1.000$ ). Das Geschlecht zeigt keinen prognostischen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Allerdings zeigt sich ein signifikanter Unterschied auf das erkrankungsfreie Intervall zugunsten des männlichen Geschlechtes ( $p=0.025$ ). Patienten des jüngeren Altermedians unter 61,8 Jahren erhielten signifikant häufiger eine adjuvante Therapie ( $p=0.042$ ). Daneben zeigen jüngere Patienten einen Trend zu längerem Überleben ( $p=0.082$ ) und erkrankungsfreiem Intervall ( $p=0.068$ ). Eine mögliche Begründung könnte darin liegen, dass jüngere Patienten häufiger eine Maximaltherapie und Dosisescalation trotz erwartbarer therapiebedingter Toxizität bei einer vermuteten besseren Toleranz der Nebenwirkungen erhalten.

So berichten auch Cooper et al. und Sinha et al. 2017 in einem Update der RTOG-9501 und EORTC-22931, dass insbesondere Patienten mit gutem klinischen Allgemeinzustand und postoperativem Vorliegen von Hochrisikofaktoren von einer kombinierten Radiochemotherapie profitieren würden. Einschränkend wird allerdings kommentiert, dass in den vorbenannten Studien keine Sub-Analyse nach HPV-Status vorgenommen wurde und von den Autoren diskutiert wird, dass diese Subgruppe eventuell nicht von der Addition einer Chemotherapie profitieren könnte [25, 26, 118].

In der EORTC-22931 und der RTOG-9501 konnte der Einfluss einer adjuvanten Therapie bei lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen unterschieden nach alleiniger Radiatio versus kombinierter simultaner Radiochemotherapie untersucht werden [13, 14, 26]. Die 10-Jahres-Auswertung der RTOG-9501 zeigt durch die Hinzunahme von Cisplatin bei *R1*-Resektion und extranodaler Extension signifikant seltener lokales Therapieversagen von 33,1% gegen 21,0% ( $p=0.02$ ) und ein verbessertes erkrankungsfreies Überleben von 12,3% gegen 18,4% ( $p=0.05$ ). Für das Gesamtüberleben wird für diese Subgruppe mit 19,6% gegen 27,1% ( $p=0.07$ ) statistisch knapp das Signifikanzniveau verfehlt [26].

In der EORTC-22931 zeigt sich nach medianem Follow-Up von 60 Monaten ein signifikant besseres progressionsfreies Überleben durch die adjuvante simultane Radiochemotherapie [HR 0,75; KI: 0,56-0,99;  $p=0.04$ ] und ein 5-Jahres progressionsfreies Überleben von 47% gegen 36% bei alleiniger Bestrahlung [14]. Unsere vorliegenden Daten verfehlen diesen Unterschied bezüglich des erkrankungsfreien Überlebens ( $p=0.997$ ) und zeigen ein 5-Jahres erkrankungsfreies Überleben von 48,9% versus 52,1%. Das Gesamtüberleben des Kombinationsarms zeigt sich in der EORTC-22931 signifikant besser [HR 0,70; KI: 0,52-0,95;  $p=0.02$ ]. Die mediane Zeit bis zum Tod ist mit 32 Monaten gegenüber 72 Monaten zu Gunsten des Kombinationsarms mehr als verdoppelt, wobei die 5-Jahres-Überlebensrate mit 40% bei

alleiniger Bestrahlung gegenüber 53% in der kombinierten Therapiegruppe angegeben wird [14]. In der hier vorliegenden Untersuchung beträgt die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate ohne Adjuvanz 74,9%, bei alleiniger Bestrahlung 60,3% und liegt in der kombinierten Therapie bei 59,5%. Hierbei zeigt sich das durchschnittliche Überleben nach alleiniger adjuvanter Radiotherapie mit 48,2 Monaten [KI: 38,8 – 57,6] und adjuvanter kombinierter Radiochemotherapie mit 48,6 Monaten [KI: 37,1 – 60,0] vergleichbar. Patienten, bei denen aufgrund fehlender Risikofaktoren auf die Adjuvanz verzichtet werden konnte, leben mit 60,2 Monaten [KI: 50,6 – 69,8;  $p=0.417$ ] insgesamt am längsten. Ohne Adjuvanz wird ein Gesamtüberleben von 49,4%, mit alleiniger Radiotherapie von 48,9% und bei kombinierter Radiochemotherapie von 52,1% erreicht. Im Vergleich der Gruppen *Adjuvanz* gegenüber *keine Adjuvanz* zeigt sich somit statistisch kein Unterschied bezogen auf das Gesamtüberleben ( $p=0.107$ ). Es zeigt sich jedoch ein Trend bezüglich postoperativer Radiotherapie als Surrogat für das vermehrte Vorliegen von Hochrisiko Karzinomen, wobei ein signifikantes Niveau möglicherweise aufgrund der geringen Patientenzahl verpasst wird. Insbesondere muss beachtet werden, dass die vorliegende Untersuchung im Gegensatz zu den Studien EORTC-222931 und RTOG-9501 keine randomisierte Studie ist und das Kollektiv bereits Leitlinien-gerecht auf Grundlage des Vorliegens oder Fehlens von Risikofaktoren individualisiert in die jeweiligen Therapiearme stratifiziert wurde. Somit liegen bei den Patienten der adjuvanten Gruppen onkologisch unvorteilhaftere und schwerere Tumorvarianten vor. Es lässt sich in der retrospektiven Auswertung allerdings vermuten, dass postoperativ detektierbare negative histopathologische Faktoren durch eine adjuvante Therapieform in Hinblick auf die untersuchten klinischen Endpunkte erfolgreich ausgeglichen werden können.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Durchführung einer adjuvanten Behandlung und die Wahl der Therapiemodalität und Bestrahlungsdosis insgesamt negative tumorspezifische Kriterien ausgleichen können. Die leitliniengerechte Stratifikation in adjuvante Behandlungsarme nach Operation fortgeschrittener Mundhöhlenkarzinome demonstriert effektiv, dass insbesondere jüngere und fittere Patienten von einer risikoadjustierten Maximaltherapie profitieren.

### **5.2.3.1 Carboplatin versus Cisplatin bei simultaner Radiochemotherapie**

Die simultane Radiochemotherapie erfolgte in unserer Kohorte als monotherapeutische Gabe von Carboplatin AUC1 an d1-5 und d29-33 der Bestrahlung.

Der Vergleich der Wahl simultaner Chemotherapien mit Carboplatin gegenüber Cisplatin konnte durch die Southwest Oncology Group (SWOG) im Rahmen einer randomisierten Behandlung bei lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumorrezidiven im UICC-Stadium IV bei gleichzeitiger Gabe

von 5-Fluoro-Uracil (5-FU) an insgesamt 261 Patienten mit einem Kontrollarm mit monotherapeutischer Gabe von Methotrexat (MTX) untersucht werden [36]. Eine komplette- und partielle Remission zeigt sich im Cisplatin/5-FU Arm in 32% der Fälle und damit häufiger gegenüber 21% im Carboplatin/5-FU Arm und wird mit lediglich 10% unter MTX-Gabe beobachtet. Ein Subgruppenvergleich von Carboplatin gegen Cisplatin wurde nicht durchgeführt, allerdings ist Cisplatin hochsignifikant ( $p < 0.001$ ) und Carboplatin signifikant ( $p = 0.05$ ) effektiver als MTX [36].

Andrés et al. zeigen in einem neoadjuvant behandelten Kollektiv einen prognostisch günstigeren Verlauf durch Wahl von Cisplatin gegenüber Carboplatin in Kombination mit 5-FU [5]. Bereits nach Einschluss von 95 Patienten wurde diese prospektive Studie frühzeitig beendet, da sich ein signifikant verbessertes Therapieansprechen zu Gunsten der Cisplatin/5-FU Kombination ( $p = 0.04$ ) zeigte. Das 5-Jahres Gesamtüberleben wird mit 49% gegen 25% ( $p = 0.03$ ) und die 5-Jahres erkrankungsfreie Überlebensrate mit 47% gegen 24% ( $p = 0.02$ ) im Vergleich von Cisplatin/5-FU gegenüber Carboplatin/5-FU berichtet [5].

Im vorliegenden Kollektiv erfolgte die Chemotherapie mit Carboplatin, sodass die Wahl des Chemotherapeutikums möglicherweise einen prognostischen Einfluss auf die Wirksamkeit der Radiochemotherapie besitzen könnte. Daneben könnte eine mögliche Ursache für einen fehlenden statistischen Effekt in der vorliegenden Untersuchung die Applikationsfrequenz von Carboplatin an d1-5 und d29-33, sowie die tägliche Dosierung per AUC1 beeinflusst sein.

Die Wahl von Carboplatin anstelle von Cisplatin, welches sowohl in RTOG-9501 und EORTC-22931 als Standardchemotherapeutikum mit  $100\text{mg}/\text{m}^2$  KOF an den Tagen 1, 22 und 43 verwendet wurde, könnte möglicherweise biologisch nicht äquivalent sein und dadurch einen Ergebniseinfluss besitzen. So bewertet die deutsche S3-Leitlinie für simultane Radiochemotherapieverfahren, dass Cisplatin als medikamentöse Tumortherapie die größte Bedeutung zukommt und bei Verwendung von Polychemotherapiekonzepten ohne Cisplatin signifikant schlechtere Ergebnisse detektiert werden können [8].

Eine systematische Metaanalyse bei Nicht-Nasopharynxkarzinomen von Szturz et al. [125] untersucht den Vergleich von wöchentlicher Low-Dose Cisplatingabe mit  $< 50\text{mg}/\text{m}^2$  KOF bei mehr als sechs einzelnen Gaben gegenüber einer drei wöchentlichen High-Dose Cisplatingabe mit drei intendierten Gaben von je  $100\text{mg}/\text{m}^2$  KOF und normofraktionierter Bestrahlung. In der Auswertung von 52 Studien mit 4.209 Patienten zeigt sich für die postoperative Behandlung kein Unterschied im Gesamtüberleben. Auch die Systemtherapiecompliance wird mit 71% [KI: 45 - 88%] bei wöchentlichem und 64% [KI: 59 - 70%] bei drei-wöchentlichem Konzept ( $p = 0.574$ ) angegeben und unterscheidet sich statistisch nicht voneinander. Die Patienten der High-Dose Gruppe erhielten mit 77% [KI: 47 - 93%] allerdings häufiger mindestens  $200\text{mg}/\text{m}^2$  KOF Cisplatin

gegenüber 62% [KI: 42 - 79%] in der Low-Dose Kohorte, ohne ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen ( $p=0.374$ ). Auch die Komplettierung der Bestrahlung zeigt mit 93% [KI: 86 - 97%] bei Low-Dose gegen 90% [KI: 86 - 93%] bei High-Dose keinen signifikanten Unterschied ( $p=0.407$ ). Jedoch wird eine höhere Rate von akuten Nebenwirkungen bei Applikation als wöchentliches Low-Dose-Konzept berichtet. Als Therapieassoziierte akute Nebenwirkungen werden Dysphagie der Grade III bis IV mit 54% [KI: 35 - 73%] gegenüber 20% [KI: 12-32%] ( $p = 0.0026$ ) und Gewichtsverlust mit 21% [KI: 11 - 36%] gegen 3% [KI: 1-5%) ( $p < 0.0001$ ) allerdings häufiger beobachtet [125].

Man kann somit vermuten, dass die postoperativen Behandlungskonzepte in Bezug auf die Therapieergebnisse vergleichbar sind, jedoch unterschiedliche Nebenwirkungsprofile aufweisen. Dennoch konkludieren Szturz et al. im Rahmen einer Literaturrecherche die drei-wöchentliche Hochdosis Cisplatingabe simultan zur Radiotherapie als präferierte Behandlungsform [124].

Im Gegensatz zu unserer Kohorte, in der eine vollständige Applikation aller intendierten Gaben Carboplatin erfolgen konnte, wurden in der High-Dose Cisplatingruppe in nur 64% der Fälle alle drei intendierten Zyklen appliziert.

Noronha et al. untersuchen in einer monozentrischen Phase III Studie zwischen 2013 und 2017 an 300 Patienten mit 1:1 Randomisierung einer kurativ intendierten adjuvanten Radiochemotherapie mit Cisplatin  $30\text{mg}/\text{m}^2$  KOF wöchentlich versus  $100\text{mg}/\text{m}^2$  KOF drei-wöchentlich [92]. Der beabsichtigte Nachweis einer Nicht-Unterlegenheit des wöchentlichen Konzeptes konnte nicht gezeigt werden und die 2-Jahres Lokale-Kontrollrate lag mit 73,1% gegen 58,5% ( $p=0.014$ ) zu Gunsten der drei-wöchentlichen Gruppe. Es muss jedoch beachtet werden, dass sich die Behandlungen bezüglich der applizierten kumulativen medianen Dosis mit  $210\text{mg}/\text{m}^2$  KOF gegen  $300\text{mg}/\text{m}^2$  KOF, sowie der medianen Dosisintensität von  $30,7\text{ mg}/\text{m}^2/\text{Woche}$  bzw.  $42\text{ mg}/\text{m}^2/\text{Woche}$  deutlich voneinander unterscheiden. Allerdings zeigen sich in der wöchentlichen Gruppe geringere höhergradige akute Toxizitäten mit 71,6% gegen 84,6% ( $p=0.006$ ) ohne den Nachweis vermehrter chronifizierender Nebenwirkungen. Die mediane progressionsfreie Zeit bei wöchentlicher gegenüber drei-wöchentlicher Gabe wird mit 17,7 Monaten [KI: 0,42 – 35,05] versus 28,6 Monaten [KI: 15,9 – 41,3] berichtet ( $p=0.21$ ) [92]. Im Vergleich zeigt die in dieser Arbeit vorliegende Datenauswertung eine bessere durchschnittliche erkrankungsfreie Zeit im Radiochemotherapiekollektiv mit 46,6 Monaten [KI: 34,8 – 58,3] und ist damit beinahe doppelt so hoch wie bei Noronha et al. berichtet.

Es lässt sich feststellen, dass negative prognostische Faktoren und Risikokonstellationen, die zur adjuvanten Triagierung führen, durch die Wahl der Adjuvanzform und Radiotherapiedosis möglicherweise ausgeglichen werden können. Insbesondere jüngere Patienten scheinen

häufiger eine adjuvante Maximaltherapie erhalten zu haben und könnten möglicherweise von einer gesteigerten Therapiecompliance durch vollständig applizierte intendierte Chemotherapiezyklen profitieren haben. Möglicherweise könnte die Therapieeffektivität in der vorliegenden Arbeit durch die Wahl der Chemotherapie mit Carboplatin und der Applikationszyklen entgegen moderner etablierter Radiochemotherapieverfahren variieren.

### 5.3 Humane Papillomaviren, Rauchen und Alkohol

In der Onkogenese von Kopf-Hals-Karzinomen wird humanen Papillomaviren eine kausale Rolle zugeteilt [1] und Patienten mit HPV-positiven Tumoren zeigen seltener eine Assoziation zu Alkohol- und Nikotinabusus [90].

Insbesondere im p53 und pRb Stoffwechsel HPV-positiver und HPV-negativer Kopf-Hals Karzinome zeigen sich molekularbiologische Unterschiede. Dabei sind HPV-positive Tumoren durch einen p53 Wildtyp charakterisiert, der durch Bindung an das E6 Virusprotein inaktiviert wird. Dies führt zu einer Herabregulation von pRb und Hochregulation von p16. HPV-negative Tumore zeichnen sich dagegen häufig durch p53 Mutationen aus und zeigen eine Hochregulation von pRb und Abnahme von p16 [109]. Diese Variationen der Genexpression scheinen unterschiedliche Entitäten und Erkrankungsverläufe zu verursachen [53].

HPV-positive Schleimhautzellen können molekularpathologisch in 6,9% der US-amerikanischen Bevölkerung nachgewiesen werden, ohne einen direkten Krankheitswert zu besitzen. Insgesamt ist der High-Risk HPV16 Nachweis bei Männern mit 10,1% gegenüber 3,6% bei Frauen dreifach erhöht [40]. Männliche Patienten der hier vorliegenden Untersuchung zeigen mit 51,2% signifikant häufiger HPV-positive Tumoren als weibliche Patienten mit nur 22,2% (**p=0.038**). Dies entspricht einem absolut 2,3-fach gehäuften Auftreten HPV-positiver Tumore bei Männern.

Altersgruppen-, Geschlechtsanalysen und ethnische Gruppierungsuntersuchungen zeigen, dass ein Anstieg an HPV-assoziierten Tumoren insbesondere bei kaukasischen Männern in der vierten und fünften Dekade zu beobachten ist [24]. Auch in unserem Gesamtkollektiv zeigt sich ein Alterstrend, der jedoch nicht in einem signifikanten Unterschied zwischen jüngeren und älteren Patienten resultiert (66,0% vs. 51,4%; p=0.245).

Durch primär präventive HPV-Impfungen konnte der Nachweis oraler HPV-DNA bei 18- bis 33-jährigen signifikant von 1,61% auf 0,11% gesenkt werden (**p=0.008**) [22]. Somit wird vermutet, dass sich mittels HPV-Impfungen auch die Rate an Kopf-Hals Karzinomen senken lässt [151].

Da High-Risk HPV-assoziierte Oropharynxkarzinome ein signifikant geringeres Rezidiv- und Zweitkarzinomrisiko mit verlängertem Gesamtüberleben zeigen [68] ist die Untersuchung von



HPV auch bei Nicht-Oropharynx Kopf-Hals-Karzinomen intensiver Bestandteil der aktuellen wissenschaftlichen Forschung.

Die RTOG-0129 untersuchte an 433 Patienten mit Oropharynx-Plattenepithelkarzinom den prognostischen Effekt HPV-assoziiierter Tumore bei einer Behandlung mittels definitiver Cisplatin-basierender Radiochemotherapie [6]. Eine Analyse des HPV-Status konnte an 75% der Resektate erfolgen und war in 68% der Fälle positiv. Auch in unserem Kollektiv konnte eine vergleichbare Auswertung des HPV-Status an 73,8% der Präparate erfolgen. Dieser war allerdings nur in 42,4% positiv. In der RTOG-0129 zeigen HPV-positive Patienten in der 10 Jahres Zweitauswertung ein signifikant besseres Gesamtüberleben mit 71% gegenüber 30% bei HPV-negativem Trägerstatus [HR 0,34; KI: 0,22 – 0,52] und ein progressionsfreies Überleben von 64% gegen 23% [HR 0,43; KI: 0,29 – 0,64] [91]. Daneben werden sowohl seltener loko-regionäres Versagen mit 20% gegen 52% HR 0,29; KI: 0,17 – 0,48], als auch Fernmetastasierungen detektiert, wobei diese mit 10% gegenüber 16 % [HR 0,59; KI: 0,26 – 1,35] berichtet werden [91]. Patienten mit HPV-positiven Oropharynxkarzinomen zeigen nach adjuvanter Radiotherapie ebenfalls ein verbessertes Behandlungsergebnis [21].

Diese prognostisch günstigen Ergebnisse führten für Oropharynxkarzinome in der 8. Edition zu einer Veränderung der TNM-Klassifikation und einer Unterteilung in HPV-positive und HPV-negative Tumoren anhand der p16-Färbung [51, 73]. Für Nicht-Oropharynxkarzinome zeigen sich insgesamt inkonsistentere prognostische Ergebnisse einer HPV-Assoziation [1].

Das dieser Untersuchung zugrunde liegende Kollektiv zeigt möglicherweise aufgrund der anatomischen Region als Subgruppe der Nicht-Oropharynx-Karzinome divergente Ergebnisse in Bezug auf das HPV-assoziierte Überleben, erkrankungsfreie Intervall und Ansprechen auf adjuvante Therapien.

Prognostisch günstige Verläufe für das Gesamtüberleben ( $p=0.748$ ) und erkrankungsfreie Überleben ( $p=0.519$ ) lassen sich für das Mundhöhlenkarzinom in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisen, während Tian et al. an 24.740 Patienten mit Nicht-Oropharynx Karzinomen einen prognostischen Einfluss des High-Risk HPV-Status auf das Gesamtüberleben zeigen können [132]. Für die Subgruppe der 4.018 fortgeschrittenen Mundhöhlenkarzinome der American Joint Committee on Cancer (AJCC) Stadien III-IV kann in 10,6% der Fälle ein HPV Nachweis erfolgen, womit eine verbesserte Überlebensprognose [HR 0,78;  $p=0.03$ ] gezeigt werden kann [132].

Prognostisch günstigere Ergebnisse einer p16-Assoziation zeigen auch Chung et al. für Nicht-Oropharynxkarzinome. Ihre Auswertungen der RTOG-0129, RTOG-0234 und RTOG-0522 Studien zeigen für p16-positive Tumoren eine HR von 0,63 [KI: 0,42 – 0,95;  $p=0.03$ ] bzw. 0,56 [KI: 0,35 – 0,89;  $p=0.01$ ] für progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben [23].

Auch Cordes et al. untersuchen in einer Metaanalyse von 18 Studien mit insgesamt 4.424 Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen aller anatomischen Regionen den prognostischen Einfluss von HPV-DNA und p16-Status [27]. Die Tumoren werden durch die Autoren in vier Gruppen unterteilt und mit 25%  $HPV^+/p16^+$ , 61,2%  $HPV^-/p16^-$ , 7,1%  $HPV^-/p16^+$  und 6,8%  $HPV^+/p16^-$  berichtet. Das Vorliegen von  $HPV^+/p16^+$  und  $HPV^-/p16^+$  Tumoren ist signifikant mit besserem 5-Jahres Gesamt- und 5-Jahres erkrankungsfreiem Überleben assoziiert. Daneben besitzen  $HPV^-/p16^-$  und  $HPV^+/p16^-$  Tumoren eine schlechtere Prognose. Das konkomitante Vorliegen von HPV-DNA und p16 zeigt dabei die beste Prognose und lässt vermuten, dass Untersuchungen der HPV-DNA für Mundhöhlenkarzinomen ergänzend zum p16-Status klinisch relevant sein könnten [27].

In der vorliegenden Untersuchung basiert der HPV-Nachweis allein auf einer histochemischen p16-Färbung. Die Patienten mit Mundhöhlenkarzinom wurden stratifiziert nach  $p16^+$  versus  $p16^-$  Tumor und zeigen keinen statistischen Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben ( $p=0.790$ ) und das erkrankungsfreie Überleben ( $p=0.519$ ). Eine Untersuchung der HPV-DNA ist nicht erfolgt. Die Untersuchungen von Cordes et al. [27] zeigen, dass der zusätzliche Informationsgewinn von HPV-DNA eine prognostische Relevanz haben und möglicherweise zu Änderungen der Stratifizierung des vorliegenden Kollektivs führen könnte.

Die vorliegende Untersuchung zeigt einen signifikanten Unterschied bezüglich des HPV- und Raucherstatus ( $p=0.026$ ) und unterstützt die Vermutung einer unabhängigen viralen Tumorgenese. Allerdings lässt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des HPV- und Alkoholstatus nachweisen ( $p=0.891$ ). Nichtraucher sind in 69,3% der Fälle HPV-positiv, gegenüber Rauchern mit nur 34,8%. Die RTOG-9501 zeigt, dass Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aktive Raucher sind, schlechtere Ergebnisse für die lokale Kontrolle [HR 0,74; KI: 0,46 – 1,18], das erkrankungsfreie Intervall [HR 0,88; KI: 0,67 - 1,15] und Gesamtüberleben [HR 0,83; KI: 0,63 – 1,10] aufweisen [26]. Rauchen scheint als einzelner Expositionsfaktor besonders mutagen zu wirken [19]. Lediglich 20-25% aller Kopf-Hals-Tumoren entstehen ohne Assoziation zum Rauchen [121]. Dieser Anteil ist in unserem vorliegenden Kollektiv mit 21,2% vergleichbar. Allerdings zeigt sich in der vorliegenden Untersuchung bei isolierter Betrachtung des Raucherstatus eine gegenteilige Beobachtung. Raucher besitzen gegenüber Nicht-Rauchern ein signifikant verbessertes 5-Jahres-Überleben von 73,1% gegen 36,5% ( $p=0.020$ ).

Im vorliegenden Kollektiv werden jedoch durch gleichzeitigen Nikotin- und Alkoholkonsum vermehrt multiple nebeneinander vorliegende Risikofaktoren beobachtet und betreffen 78,8% bzw. 66,3% der Patienten, sodass der Raucherstatus nicht isoliert bewertet werden kann.

In der Pathogenese der malignen Transformation können mutagene Prozesse durch Alkohol und Rauchen über einen Verlust der p53-Expression induziert werden. Dieser Pathomechanismus

kann bei kombiniertem Abusus in bis zu 58% beobachtet werden, bei isoliertem Raucherstatus in 33% und lediglich in 17% bei Abstinenz von Alkohol und Rauchen (**p=0.001** [121]).

Durch den Nachweis genetischer Mutationen, die durch das Rauchen hervorgerufen werden, konnte durch Gillison et al. bei Oropharynxkarzinomen in der RTOG-9003 und RTOG-0129 ein prognostisch negativer Einfluss auf das Gesamtüberleben detektiert werden [42]. In der RTOG-9003 zeigen 39,5% der Patienten und in der RTOG-0129 Studie 68% einen p16-positiven Status. Nach Korrektur um den HPV-Status lässt sich eine Risikoerhöhung um 1% pro Packyear in Bezug auf das progressionsfreie Überleben und den Tod beobachten [HR 1,01; KI: 1,00 – 1,01; **p=0.002**]. Darüber hinaus ist ein aktiver Nikotinabusus prognostisch schlechter und führt zu einer Risikoerhöhung von 2% pro Jahr aktiven Rauchens [HR 1,02; KI: 1,01 – 1,03; **p<0.001**]. Fortgeführter Nikotinabusus führt zu einer Verdoppelung des Risikos unter Radiotherapie zu versterben [HR 2,19; KI: 1,46 – 3,28] [42]. Bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle könnte von einem ähnlichen Zusammenhang ausgegangen werden.

Bagnardi et al. [9] und Vecchia et al. [135] konnten in Metaanalysen zeigen, dass langjähriger Alkoholabusus ein negativer Prognostikator ist und mit einem 4,1 bis 11,2-fach erhöhten Risiko zur Entwicklung von Mundhöhlenkarzinomen beiträgt [9, 135]. Dieses Risiko steigt in Abhängigkeit der Dosisexposition [9]. Dabei gilt Nikotinabusus als wichtigster isolierter Risikofaktor und führt zu einer dosisabhängigen Risikoerhöhung von 11,1 bis 12,9. Pfeifen- und Zigarrenrauchen besitzen sogar ein 20,7-fach erhöhtes Risiko. Das Risiko ist bei simultaner Exposition gegenüber Noxen darüber hinaus sogar bis zu 5,8-fach erhöht [135]. Das im vorliegenden Kollektiv beobachtete gleichzeitige Vorliegen mehrerer kanzerogener Noxen ist suggestiv dafür, dass Nicht-Oropharynx Plattenepithelkarzinomen trotz HPV-Assoziation variable Ergebnisse in Bezug auf die Prognose aufweisen könnten.

Auch die deutsche S3-Leitlinie berichtet, dass für Nicht-Oropharynx-Karzinome in drei RTOG-Studien und der dänischen DAHANCA Auswertung kein prognostischer Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens nach HPV-Stratifizierung nachgewiesen werden kann [8]. Dies unterstützt die Vermutung, dass ein simultan vorliegender Nikotin- und Alkoholabusus trotz HPV-Assoziation einen prognostisch negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben und das erkrankungsfreie Überleben aufweist. Dies lässt vermuten, dass bei Mundhöhlenkarzinomen der HPV-Status nicht isoliert betrachtet werden sollte, sondern weitere kanzerogene Faktoren in der Pathogenese und Prognose entscheidend sind. In diesem Rahmen können habituelle, virale, genetische sowie molekulare Ursachen und Umwelteinflüsse pathognomonisch sein.

## 5.4 Biomarker

Der Tumor Phänotyp wird in Folge genetischer Veränderungen und maligner Transformation über eine Vielzahl beteiligter Gene beeinflusst. Moderne Untersuchungsmethoden und Sequenzierungsverfahren machen es möglich spezifische Informationen in Bezug auf die Entwicklung von pathologischen Hochrisikofaktoren innerhalb der Tumorgenese von Mundhöhlenkarzinomen zu sammeln. Zunehmend werden Erkenntnisse zur Entstehung einer Lymphgefäßinvasion, Lymphknotenmetastasierung, erkrankungsspezifischer Daten und Überlebensprognosen in biochemischen, in-vitro und in-vivo Modellen zusammengetragen. Moderne Forschungen etablieren Erkenntnisse über mature humane Plattenepithelkarzinome, prä-maligne Strukturen, Einflussfaktoren im Rahmen der Tumorgenese und strukturelle Veränderungen innerhalb prätherapeutischer Präparate. Daraus lassen sich Nomogramme erstellen und Behandlungsergebnisse an multimodal behandelten Kollektiven ableiten. Wreesmann et al. [146] konnten mittels komparativer Genom Hybridisierung insgesamt 38 unterschiedliche Genvariationen mit signifikantem Einfluss auf das erkrankungsspezifische Überleben für Kopf-Hals-Tumoren nachweisen. Aus insgesamt 207 untersuchten Aberrationen konnten fünf Chromosomen-Aberrationen signifikant mit der Prognose der Tumorerkrankung assoziiert werden ( $p=0.0009$  bis  $p=0.01$ ).

Diese identifizierten Chromosomen kodieren im Rahmen der Translation häufig an der Pathogenese involvierte Biomarker, Zell-Rezeptoren und nukleäre Targets [146].

Die im vorliegenden Kollektiv untersuchten Biomarker *PKM2*, *COX-2*, *EGFR* und *VEGF* zeigen keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben oder das erkrankungsfreie Überleben, sodass im weiteren Verlauf der Diskussion vermehrt *Podoplanin*, *Moesin* und *SMR3A* betrachtet werden.

### 5.4.1 Podoplanin

Die Podoplanin-Expression induziert in Tumorstadien die Entwicklung von Tumoren.

Während gut-differenzierte Karzinome kein Podoplanin exprimieren, zeigen moderat differenzierte Karzinome eine Podoplanin-Expression ausschließlich an der invasiven Front und undifferenzierte Plattenepithelkarzinome ebenfalls hinter der Basalzellschicht im Zellzytoplasma [106].

Bei der Regression dieser Tumoren wird ein Verlust der Podoplanin-Expression festgestellt. Nude-Mäuse, die eine down-regulierte Podoplanin-mRNA besitzen, haben neben einer signifikant verminderten Tumor-Wachstumsrate eine signifikant erniedrigte Podoplanin-Expression in den formierten Tumoren [97].

Bei humanen Mundhöhlenkarzinomen liegt eine heterogene Podoplanin-Expression vor [99]. Dabei wird Podoplanin vermehrt in den Endothelzellen des lymphatischen Gefäßsystems exprimiert [107], ohne in den Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert zu werden [148]. Über Zellmotilitätssteigerung und aktive Veränderung des Aktin Zytoskeletts kann eine Tumordinvasion gefördert werden [74]. Charakteristisch für aggressive Verläufe von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches sind die lokoregionäre Tumordinvasion, Lymphangiogenese und Lymphknotenmetastasierung [90].

Yuan et al. untersuchen die Assoziation der lymphatischen Metastasierung und Podoplanin-Expression [148]. Sie konnten zeigen, dass Podoplanin bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches vermehrt exprimiert wird und signifikant mit Lymphknotenmetastasierung und Lymphangiogenese korreliert [148]. Untersuchungen eines Patientenkollektivs von 20 Männern und Frauen mit Mundhöhlenkarzinomen zeigen bei Bartuli et al. einen vergleichbaren Einfluss [11]. Eine gesteigerte Podoplanin-Expression, die bei 45% der Patienten beobachtet wird, zeigt signifikant häufiger eine Lymphknotenmetastasierung ( $p < 0.001$ ).

Bartuli et al. stellen in ihrer Studie fest, dass Podoplanin nicht in histopathologisch unauffälligen oralen Epithelzellen exprimiert wird, aber in einigen hyperplastischen und dysplastischen Läsionen [11]. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Beobachtung, dass Patienten, die hohe Expressionsraten von Podoplanin aufweisen, statistisch häufiger Lymphknotenmetastasierungen aufzeigen ( $p < 0.001$ ).

Im vorliegenden Kollektiv ist der Nachweis einer Lymphangiogenese ( $p = 0.004$ ), einer Lymphknotenmetastasierung ( $p = 0.015$ ) und einem Extranodalwachstum ( $p = 0.041$ ) prognostisch negativ in Bezug auf das Gesamtüberleben, wobei Podoplanin hochsignifikant ( $p = 0.000$ ) mit verkürztem Gesamtüberleben korreliert ist.

De Vicente et al. zeigen in einer retrospektiven Studie an einem Kollektiv von 58 Patienten mit oraler Leukoplakie eine Korrelation der Podoplanin-Expression in den basalen und suprabasalen Schichten der Mundhöhlenschleimhaut in Bezug auf die Tumorentwicklung aus dysplastischen Zellverbänden [136]. Die Expression von Podoplanin korreliert signifikant mit dem Grad der Dysplasie ( $p < 0.0005$ ) sowie mit dem Risiko der Progression zum oralen Tumor ( $p < 0.0005$ ). Prä maligne Läsionen mit Podoplanin positiver Expression zeigen insgesamt ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung oraler Plattenepithelkarzinome [HR 8,74;  $p = 0.007$ ] [136].

Im vorliegenden Kollektiv lässt sich keine Korrelation der Podoplanin-Expression mit dem Grad der Dysplasie nachweisen. Allerdings zeigen sich hochsignifikante Assoziationen zum Nodalstadium und der extranodalen Extension ( $p < 0.001$ ), hohem UICC-Stadium ( $p < 0.001$ ), tumorassoziiertem Tod ( $p < 0.001$ ) und erkrankungsfreiem Überleben ( $p = 0.007$ ). Podoplanin kann in der multiplen linearen Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben ( $p = 0.004$ )

insgesamt als signifikanter unabhängiger molekularpathologischer Faktor nachgewiesen werden. Die Signifikanz in Bezug auf das erkrankungsfreie Überleben ( $p=0.101$ ) wird für Podoplanin knapp verfehlt.

Kreppel et al. untersuchen Podoplanin bei Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen bezüglich der prognostischen Vorhersagefähigkeit prätherapeutischer Biopsate auf das therapeutische Ansprechen neoadjuvanter Radiochemotherapie [63]. Eine Kohorte von 63 Patienten weist dabei signifikante Assoziationen der Podoplanin-Expression mit dem ypN-Status ( $p=0.004$ ) und dem ypUICC-Status ( $p<0.001$ ) auf. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, mit Podoplanin einen möglichen Prädiktor für den Behandlungserfolg bei oralen Plattenepithelkarzinompatienten und neoadjuvanter, Platin-basierender Radiochemotherapie gefunden zu haben.

Die vorliegende Arbeit zeigt einen signifikant inversen Einfluss der Podoplanin-Expression bezüglich des Gesamt- und erkrankungsfreien Überlebens. Hohe Expressionen scheinen insgesamt mit aggressiveren histopathologischen Tumorvarianten zu korrelieren und einen negativen Einfluss auf die untersuchten klinischen Endpunkte zu besitzen. So weisen Patienten ohne Podoplanin-Expression ein 2-Jahres-Überleben von 90,0%, bei schwacher Expression von 93,3%, bei moderater Expression von 86,2% und bei starker Expression von 47,4% auf. Das 5-Jahres Gesamtüberleben wird mit 90,9%, 93,3%, 64,8% und 30,7% beobachtet ( $p=0.000$ ).

Patienten ohne Podoplanin-Expression versterben innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes in lediglich 7,7% der Fälle, mit schwacher Expression in 5,6%, während bei mäßiger Expression in 43,3% und bei starker Expression in 73,7% der Fälle ein Tod beobachtet wird. Patienten ohne Podoplanin-Expression zeigen in lediglich 23,1% der Fälle einen Progress, während bei Vorliegen einer starken Expression in 68,4% ein Progress beobachtet wird ( $p=0.027$ ). Das 2-Jahres krankheitsfreie Überleben liegt bei fehlender Podoplanin-Expression bei 63,0%, bei schwacher Expression bei 67,2%, bei moderater Expression bei 75,9% und bei starker Expression bei nur 40,8%. Das 5-Jahres krankheitsfreie Überleben beträgt 63,0%, 60,5%, 55,9% und 27,2%. Kreppel et al. konnten am vorliegenden Kollektiv bereits vorab veröffentlichen, dass auch das 5-Jahres erkrankungsspezifische Überleben hochsignifikant ( $p<0.001$ ) mit steigendem Grad der Expression korreliert und ohne Expression 100% beträgt, bei schwacher 93,3%, moderater 69,7% und bei hoher Expression nur 37,2% beträgt [63].

Unsere Auswertungen können Ergebnisse aus Zellkulturen und Tierexperimenten ergänzen und unterstützen die Annahme einer Schlüsselfunktion von Podoplanin in der Tumorgenese von Mundhöhlenkarzinomen. Der vermehrte Nachweis einer Lymphknoteninvasion und deren prognostisch negativen Einfluss auf Therapieansprechen lässt einen Zusammenhang mit einer gesteigerten Expression von Podoplanin vermuten.

Obwohl hohe Podoplaninlevel hoch signifikant mit adjuvanter Therapie korrelieren, eignet sich Podoplanin im vorliegenden Kollektiv als unabhängiger prognostischer Marker zur Prognosestratifikation des untersuchten klinischen Endpunktes Gesamtüberleben und beeinflusst signifikant das erkrankungsfreie Überleben.

Somit unterstützt die vorliegende Arbeit die Annahme, dass eine vermehrte Expression von Podoplanin an der Entwicklung aggressiver Tumorvarianten trotz multimodaler Behandlungen beteiligt sein könnte. Es scheint als Prädiktor für Lymphknotenmetastasierung und Extranodalausdehnung auch bei klinisch unauffälligen Patienten geeignet zu sein. Somit unterstützen diese Ergebnisse die Vermutungen [63, 108, 148], dass Podoplanin als unabhängiger prognostisch relevanter Biomarker zur biomolekularen Klassifikation oraler Tumore dienen könnte.

#### 5.4.2 Moesin

Bei Mundhöhlenkarzinomen konnte eine vermehrte Moesin-Expression mit einer gesteigerten Zellmotilität in Verbindung gebracht werden. Es scheint eine Funktion im Rahmen der Invasion und Metastasierung zu erfüllen [66]. Dabei beinhaltet die N-terminale Hälfte die FERM bzw. 4.1-ERM Domäne und kann an der Zelloberfläche das Glykoseprotein CD44 sowie mit interzellulären Adhäsionsmolekülen binden, während es mit der C-terminalen Hälfte mit Aktin Filamenten interagiert [119]. Es kann somit das Aktin Zytoskelett an die Plasmamembran binden und ist im Rahmen der Feldkanzerogenese beteiligt, wodurch aggressive Erkrankungsverläufe vermutet werden [20].

Bei Inaktivierung von Moesin zeigt sich eine über E-Cadherin und p120-Catenin-Interaktion vermittelte Zell-Zell-Adhäsion und reduzierte Invasion, wodurch eine reduzierte membranäre und erhöhte zytoplasmatische Aktivität beobachtet werden kann. Moesin-Inaktivierung, wie sie auch über RNAi oder TIMP2 erfolgen kann, führt zu einer Herabregulierung der MT1-MMP-Expression, einer Reduktion der Zell-Motilität und der Ausbildung von Filipodien [66], weshalb Moesin strukturell als interessantes Diagnostik- und Therapie-Target vermutet werden kann.

Im vorliegenden Kollektiv kann Moesin als prognostisch relevanter Biomarker identifiziert werden. Bei Exklusion der Variable SMR3A, aufgrund der geringen Anzahl an Untersuchungsproben, zeigt sich für Moesin in der multiplen linearen Regressionsanalyse neben Podoplanin ( $p=0.004$ ) ein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben ( $p=0.024$ ). Dieser Trend beider Marker könnte biochemisch darin begründet sein, dass Podoplanin seine Zellinvasion nicht über Aktin, sondern über die Proteine Ezrin, Radixin und Moesin direkt beeinflusst [76].

Auch unter Einschluss von SMR3A zeigt sich für Moesin zumindest ein Trend in der multiplen linearen Regressionsanalyse. Allerdings kann kein signifikanter Unterschied für das Gesamtüberleben ( $p=0.074$ ) und das erkrankungsfreie Überleben ( $p=0.116$ ) notiert werden. Die Moesin-Expression ist im Log-Rank Test hochsignifikant mit Gesamtüberleben ( $p=0.031$ ) und erkrankungsfreiem Überleben assoziiert ( $p=0.023$ ) und führt bei hoher Expression zu einem reduzierten 5-Jahres-Überleben von 30,8% gegen 100% bei fehlender Expression. Dieser prognostisch negative Einfluss wird auch in der Betrachtung des 5-Jahres krankheitsfreien Überlebens bei starker Moesin-Expression mit 38,5% gegenüber 100% bei fehlender Moesin-Expression bestätigt. Barros et al. können für die Expression von Moesin ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben zeigen ( $p=0.025$ ) und berichten eine 5-Jahres Gesamtüberlebensrate von 22,7% bei starker gegenüber 38,5% bei schwacher Expression [10]. Moesin stellt in der vorliegenden Untersuchung einen isolierten prognostisch relevanten Biomarker bei Kopf-Hals-Tumoren dar.

### 5.4.3 SMR3A

Die vorliegende Arbeit ist die erste wissenschaftliche Arbeit, die eine Expression von SMR3A bei Mundhöhlenkarzinomen untersucht.

Im Gegensatz zu Podoplanin, für das wesentliche prognostische Informationen vorliegen, sind die wissenschaftlichen Informationen für SMR3A unvollständig. Bislang konnte SMR3A bei Oropharynxkarzinomen mit verminderter klinischer Prognose und reduziertem Gesamtüberleben nachgewiesen werden [56].

SMR3A und Podoplanin verpassen im vorliegenden Kollektiv knapp eine statistisch signifikante Korrelation ( $p=0.062$ ). Hierbei könnte die geringe Anzahl von 28 Proben, an denen eine SMR3A-Expression untersucht wurde, entscheidenden Einfluss besitzen.

Innerhalb der SMR3A Untersuchungskohorte erfolgte in 71,4% der Fälle eine adjuvante Therapie. Es zeigt sich hierbei keine Assoziation von SMR3A-Expression und den klassischen histopathologischen Kriterien *T-Stadium* ( $p=0.379$ ), *UICC-Stadium* ( $p=0.379$ ), *Lymphangiosis* ( $p=0.507$ ), sowie *Nodalstatus-und-Extranodale-Extension* ( $p=0.511$ ).

Während Koffler et al. bei Oropharynxkarzinomen in 36% der Fälle eine hohe SMR3A-Expression nachweisen [56], beträgt diese im vorliegenden Kollektiv lediglich 25%. Obwohl der Großteil der Präparate mit 25% SMR3A-negativ oder mit 32,1% schwach positiv ist, zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied der Expressionsgruppen bezüglich des Gesamtüberlebens ( $p=0.001$ ). Auch Tod ( $p<0.001$ ) und tumorassoziierter Tod ( $p=0.005$ ) zeigen eine quantitative Assoziation zu der SMR3A-Expression.



In der Studie von Thierauf et al. werden bei Adenoidzystischen Karzinomen eines Kollektivs aus 86 Patienten mit einem medianen erkrankungsfreien Überleben von 37 Monaten und einem Gesamtüberleben von 75 Monaten vergleichbar starke SMR3A-Expressionslevel in 27,9% der Präparate nachgewiesen [129]. Dabei konnten keine signifikanten Einflüsse auf das erkrankungsfreie Intervall ( $p=0.467$ ), Gesamtüberleben ( $p=0.832$ ) und Metastasen freie Überleben ( $p=0.678$ ) festgestellt werden [129].

Im vorliegenden Kollektiv kann bei fehlender SMR3A-Expression kein Todesfall beobachtet werden. Mit schwacher Expression versterben 11,1%, während der Tod bei 40,0% mit mäßiger und 85,7% mit starker Expression von SMR3A beobachtet wird. Das 5-Jahres-Überleben nimmt mit steigendem Grad der Expression von fehlender, schwacher, mäßiger und starker Ausprägung signifikant ab und beträgt 100%, 88,9%, 50,0% und 42,9% ( $p=0.026$ ).

Auch Koffler et al. zeigen bei Patienten mit Oropharynxkarzinomen nach operativer Behandlung einen vergleichbaren signifikanten Einfluss hoher SMR3A-Expressionslevel mit verringertem Gesamtüberleben im Vergleich zu schwacher und moderater SMR3A-Expression ( $p=0.03$ ). Demgegenüber zeichnet sich für Patienten mit schwachem oder moderatem SMR3A-Expressionslevel ein verbessertes progressionsfreies Überleben ( $p=0.02$ ) ab [56]. Im vorliegenden Kollektiv konnte für das erkrankungsfreie Intervall allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Trotz der geringen Patientenzahl zeigt die multiple lineare Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben bei Inklusion von SMR3A, dass dieses als statistisch hochsignifikanter unabhängiger prognostischer Marker ( $p=0.002$ ) für das Gesamtüberleben bei Mundhöhlenkarzinomen nachweisbar ist. Bei Exklusion der Variable SMR3A konnten auch für Podoplanin ( $p=0.004$ ) und Moesin ( $p=0.024$ ) signifikante unabhängige Faktoren für das Gesamtüberleben detektiert werden. Koffler et al. zeigen für Oropharynxkarzinome mit hoher SMR3A-Expression gegen niedrige SMR3A-Expression eine HR von 2.32 (KI: 1,03 – 5,23) für das Gesamtüberleben. Insbesondere für HPV-negative Tumoren mit hoher SMR3A-Expression wird ein verkürztes Gesamtüberleben berichtet ( $p=0.04$ ). Für Mundhöhlenkarzinome kann diese Assoziation für HPV-negative Tumore nicht nachgewiesen werden ( $p=1.000$ ) [56], was auch für unser Kollektiv zutrifft.

Die vorliegenden Auswertungen zeigen für das erkrankungsfreie Überleben keinen SMR3A abhängigen Einfluss ( $p=0.586$ ), allerdings zeigt sich ein prognostischer Trend. Ohne Nachweis einer SMR3A-Expression kommt es in lediglich 14,3% der Fälle zu einem Erkrankungsprogress, während dieser bei starker Expression in 57,1% vorliegt ( $p=0.462$ ). Für unterschiedliche histopathologische Varianten von Kopf-Hals-Tumoren scheint die SMR3A-Expression variable Einflüsse auf das Gesamtüberleben und krankheitsfreie Überleben zu haben, wobei sich Speicheldrüsenkarzinome deutlich von Oropharynx- und Mundhöhlenkarzinomen

unterscheiden. Für die im hier untersuchten Kollektiv vorliegenden fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle scheint die SMR3A-Expression trotz der geringen Stichprobe eine Schlüsselrolle in der Pathogenese zu detektieren.

Die Vorliegende Untersuchung detektiert die hohe SMR3A-Expression als hochsignifikanten unabhängigen Risikofaktor für das Gesamtüberleben und lässt einen prognostischen Trend bezüglich des erkrankungsfreien Überlebens erkennen. SMR3A könnte möglicherweise als unabhängiger prognostischer Biomarker dazu dienen, Patienten mit hohem Risikoprofil für Therapieversagen und tumorassoziiertem Tod aufzudecken.

## 6 Limitation und Ausblick

Die vorliegende Arbeit ist keine randomisierte und prospektiv angelegte Untersuchung, sondern eine retrospektive Betrachtung, weshalb die Empirie der Daten eingeschränkt sein kann. Im Rahmen der operativen Behandlung könnten bei einzelnen Patienten Risikofaktoren detektiert worden sein, die eine primär chirurgische Intervention obsolet gemacht hätten. Dies stellt im Kontext multimodaler Behandlungen komplex erkrankter Tumorpatienten eine alltägliche Herausforderung interdisziplinärer Therapien dar und bietet einen interessanten Patientenquerschnitt sämtlicher Erkrankungsstadien, Stagingergebnisse und histologischer Varianten.

Weitere wissenschaftliche Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Tumorproben sind notwendig, um den Einfluss von SMR3A, Podoplanin und Moesin und deren Expression im Tumormilieu als Indikatoren für patientenspezifisches Überleben, Erkrankungsdynamik, Rezidiv-Entwicklung und Therapieansprechen validieren und vergleichen zu können.

Untersuchungen des Expressionsverhaltens in Tumor- und Lymphknotenbiopsien könnten dazu beitragen, Risikokollektive für Therapieversagen bereits prätherapeutisch zu detektieren und Behandlungen entsprechend zu modifizieren.

Auf dieser Grundlage könnten Hinweise gesammelt werden, um das tumorspezifische Verhalten von Zellen und deren Interaktion im Rahmen der Tumorgenese nachzuvollziehen und zielgerichtete Therapien auf Gen-modulatorischer Ebene, durch Interaktionen mit Zelloberflächenrezeptoren und nukleären Targets zu entwickeln.

Für prospektive randomisierte Untersuchungen ist es notwendig, einen Konsens in der Etablierung von Qualitätskriterien und Graduierungen von Expressionsverhalten vielversprechender Tumormarker zu etablieren, damit validierte Parameter in zukünftige präklinische und klinische Studiendesigns einfließen können. Insbesondere randomisierte standardisierte Protokolle mit normierten Sequenzen im Rahmen des Stagings und der operativen Therapie wären neben konsistenten strahlentherapeutischen, sowie systemtherapeutischen Dosisverschreibungen medikamentöser Tumortherapien notwendig, um spezifische therapeutische Effekte besser zu identifizieren, das Vermischen von Therapieabläufen zu vermeiden und die Interpretation von Ergebnissen zu vereinheitlichen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aaron, Lewis, Kang R, Levine A, Maghami E (2015) The New Face of Head and Neck Cancer: The HPV Epidemic. <https://www.cancernetwork.com/view/new-face-head-and-neck-cancer-hpv-epidemic>. Zugegriffen: 10. März 2022
2. Abrahao AC, Castilho RM, Squarize CH et al (2010) A role for COX2-derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. *Oral Oncology* 46:880–887. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.09.005>
3. Altenberg B, Greulich KO (2004) Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84:1014–1020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.08.010>
4. Andreasen S, Kiss K, Mikkelsen LH et al (2019) An update on head and neck cancer: new entities and their histopathology, molecular background, treatment, and outcome. *APMIS* 127:240–264. <https://doi.org/10.1111/apm.12901>
5. Andrés LD, Brunet J, López-Pousa A et al (2016) Randomized trial of neoadjuvant cisplatin and fluorouracil versus carboplatin and fluorouracil in patients with stage IV-M0 head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.1995.13.6.1493>
6. Ang KK, Harris J, Wheeler R et al (2010) Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med* 363:24–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217>
7. Assao A, Yoshino PM, Medeiros MCM et al (2018) Moesin Involvement in Oral Carcinogenesis of the Lower Lip. *Anticancer Res* 38:2755–2760. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12518>
8. AWMF - Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V (2021) S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. Leitlinienprogramm Onkologie:157. [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/Version\\_3/LL\\_Mundhoehlenkarzinom\\_Langversion\\_3.0.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/Version_3/LL_Mundhoehlenkarzinom_Langversion_3.0.pdf). Zugegriffen: 10. März 2022
9. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G (2001) Alcohol Consumption and the Risk of Cancer. *Alcohol Res Health* 25:263–270
10. Barros FBA, Assao A, Garcia NG et al (2018) Moesin expression by tumor cells is an unfavorable prognostic biomarker for oral cancer. *BMC Cancer* 18:53. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3914-0>
11. Bartuli F, Luciani F, Caddeo F et al (2012) Podoplanin in the development and progression of oral cavity cancer: a preliminary study. *Oral Implantol (Rome)* 5:33–41
12. Berger M, Grau E, Saure D et al (2015) Occurrence of cervical lymph node metastasis of maxillary squamous cell carcinoma - A monocentric study of 171 patients. *J Craniomaxillofac Surg* 43:2195–2199. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.09.009>
13. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF et al (2005) Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: A comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head & Neck* 27:843–850. <https://doi.org/10.1002/hed.20279>
14. Bernier J, Domenge C, Ozsahin M et al (2004) Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 350:1945–1952. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032641>
15. Blatt S, Krüger M, Ziebart T et al (2017) Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 45:722–730. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.01.033>
16. Bosch FX, Broker TR, Forman D et al (2013) Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. *Vaccine* 31:H1–H31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.003>

17. Botta L, Gatta G, Trama A et al (2020) Incidence and survival of rare cancers in the US and Europe. *Cancer Med* 9:5632–5642. <https://doi.org/10.1002/cam4.3137>
18. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H et al (1999) Angiosarcomas Express Mixed Endothelial Phenotypes of Blood and Lymphatic Capillaries. *Am J Pathol* 154:385–394
19. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM et al (2009) Association between Cigarette Smoking and Mutation of the p53 Gene in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. <https://doi.org/10.1056/NEJM199503163321104>
20. Califano J, Riet P van der, Westra W et al (1996) Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. *Cancer Res* 56:2488–2492
21. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML (2008) Incidence Trends for Human Papillomavirus–Related and –Unrelated Oral Squamous Cell Carcinomas in the United States. *JCO* 26:612–619. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.1713>
22. Chaturvedi AK, Graubard BI, Broutian T et al (2018) Effect of Prophylactic Human Papillomavirus (HPV) Vaccination on Oral HPV Infections Among Young Adults in the United States. *J Clin Oncol* 36:262–267. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.0141>
23. Chung CH, Zhang Q, Kong CS et al (2014) p16 protein expression and human papillomavirus status as prognostic biomarkers of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 32:3930–3938. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.5228>
24. Conway DI, Purkayastha M, Chestnutt IG (2018) The changing epidemiology of oral cancer: definitions, trends, and risk factors. *British Dental Journal* 225:867–873. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.922>
25. Cooper JS, Fortpiet C, Gregoire V et al (2017) The role of postoperative chemoradiation for oropharynx carcinoma: A critical appraisal revisited. *Cancer* 123:12–16. <https://doi.org/10.1002/cncr.30266>
26. Cooper JS, Zhang Q, Pajak TF et al (2012) Long-term Follow-up of the RTOG 9501/Intergroup Phase III Trial: Postoperative Concurrent Radiation Therapy and Chemotherapy in High-Risk Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 84:1198–1205. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.05.008>
27. Coordes A, Lenz K, Qian X et al (2016) Meta-analysis of survival in patients with HNSCC discriminates risk depending on combined HPV and p16 status. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 273:2157–2169. <https://doi.org/10.1007/s00405-015-3728-0>
28. Cowan JM, Beckett MA, Ahmed-Swan S, Weichselbaum RR (1992) Cytogenetic Evidence of the Multistep Origin of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 84:793–797. <https://doi.org/10.1093/jnci/84.10.793>
29. Davis-Smyth T, Chen H, Park J et al (1996) The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J* 15:4919–4927
30. Dong G, Mao Q, Xia W et al (2016) PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis (Review). *Oncology Letters* 11:1980–1986. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4168>
31. Dyke DLV, Worsham MJ, Drumheller T et al (1994) Recurrent cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Genes, Chromosomes and Cancer* 9:192–206. <https://doi.org/10.1002/gcc.2870090308>
32. Dzioba A, Aalto D, Papadopoulos-Nydam G et al (2017) Functional and quality of life outcomes after partial glossectomy: a multi-institutional longitudinal study of the head and neck research network. *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery* 46:56. <https://doi.org/10.1186/s40463-017-0234-y>
33. F B, J F, I S et al (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

34. Fan CY (2001) Genetic alterations in head and neck cancer: interactions among environmental carcinogens, cell cycle control, and host DNA repair. *Curr Oncol Rep* 3:66–71. <https://doi.org/10.1007/s11912-001-0045-0>
35. Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N et al (2019) Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017. *JAMA Oncol* 5:1749–1768. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.2996>
36. Forastiere AA, Metch B, Schuller DE et al (1992) Randomized comparison of cisplatin plus fluorouracil and carboplatin plus fluorouracil versus methotrexate in advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck: a Southwest Oncology Group study. *JCO* 10:1245–1251. <https://doi.org/10.1200/JCO.1992.10.8.1245>
37. Gabrysz-Forget F, Tabet P, Rahal A et al (2019) Free versus pedicled flaps for reconstruction of head and neck cancer defects: a systematic review. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. <https://doi.org/10.1186/s40463-019-0334-y>
38. Gandarillas A, Scholl FG, Benito N et al (1997) Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis* 20:10–18. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2744\(199709\)20:1<10::AID-MC3>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2744(199709)20:1<10::AID-MC3>3.0.CO;2-M)
39. Gatta G, Botta L, Sánchez MJ et al (2015) Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EURO CARE-5 population-based study. *European Journal of Cancer* 51:2130–2143. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.07.043>
40. Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL et al (2012) Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010. *JAMA* 307:693–703. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.101>
41. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C (2015) Epidemiology of Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 33:3235–3242. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.6995>
42. Gillison ML, Zhang Q, Jordan R et al (2012) Tobacco Smoking and Increased Risk of Death and Progression for Patients With p16-Positive and p16-Negative Oropharyngeal Cancer. *JCO* 30:2102–2111. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.4099>
43. Grandis JR, Tweardy DJ, Melhem MF (1998) Asynchronous modulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor protein expression in progression of premalignant lesions to head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 4:13–20
44. Greenhough A, Smartt HJM, Moore AE et al (2009) The COX-2/PGE 2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30:377–386. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp014>
45. Grégoire V, Coche E, Cosnard G et al (2000) Selection and delineation of lymph node target volumes in head and neck conformal radiotherapy. Proposal for standardizing terminology and procedure based on the surgical experience. *Radiotherapy and Oncology* 56:135–150. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(00\)00202-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(00)00202-4)
46. Grønhoj C, Jensen DH, Dehlendorff C et al (2018) Development and external validation of nomograms in oropharyngeal cancer patients with known HPV-DNA status: a European Multicentre Study (OroGrams). *Br J Cancer* 118:1672–1681. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0107-9>
47. Gupta V, Bamezai RNK (2010) Human pyruvate kinase M2: A multifunctional protein. *Protein Science* 19:2031–2044. <https://doi.org/10.1002/pro.505>
48. Håkansson K, Rasmussen JH, Rasmussen GB et al (2017) A failure-type specific risk prediction tool for selection of head-and-neck cancer patients for experimental treatments. *Oral Oncology* 74:77–82. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.09.018>
49. Harris SL, Kimple RJ, Hayes DN et al (2010) Never-smokers, never-drinkers: Unique clinical subgroup of young patients with head and neck squamous cell cancers. *Head & Neck* 32:499–503. <https://doi.org/10.1002/hed.21220>

50. Hasmat S, Ebrahimi A, Gao K et al (2019) Multifocal perineural invasion is a better prognosticator than depth of invasion in oral squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 41:3992–3999. <https://doi.org/10.1002/hed.25940>
51. Huang SH, O’Sullivan B (2017) Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options in Oncol* 18:40. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0484-y>
52. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M (2012) Human Papillomavirus in Non-Oropharyngeal Head and Neck Cancers: A Systematic Literature Review. *Head and Neck Pathol* 6:104–120. <https://doi.org/10.1007/s12105-012-0368-1>
53. Jansen L, Buttman-Schweiger N, Listl S et al (2018) Differences in incidence and survival of oral cavity and pharyngeal cancers between Germany and the United States depend on the HPV-association of the cancer site. *Oral Oncology* 76:8–15. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.11.015>
54. Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V et al (2008) Podoplanin: A Novel Marker for Oral Cancer Risk in Patients With Oral Premalignancy. *JCO* 26:354–360. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.4072>
55. Koch-Institut R Krebs in Deutschland für 2017/2018. :172 [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/krebs\\_in\\_deutschland\\_2021.pdf;jsessionid=765DE791F5C7B80655129C22E446DD24.internet072?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf;jsessionid=765DE791F5C7B80655129C22E446DD24.internet072?__blob=publicationFile). Zugegriffen: 10. März 2022
56. Koffler J, Holzinger D, Sanhueza GA et al (2013) Submaxillary gland androgen-regulated protein 3A expression is an unfavorable risk factor for the survival of oropharyngeal squamous cell carcinoma patients after surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270:1493–1500. <https://doi.org/10.1007/s00405-012-2201-6>
57. Kokemueller H, Brachvogel P, Eckardt A, Hausamen J-E (2002) Neck dissection in oral cancer—clinical review and analysis of prognostic factors. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 31:608–614. <https://doi.org/10.1054/ijom.2002.0265>
58. Koo BS, Lim YC, Lee JS, Choi EC (2006) Management of contralateral N0 neck in oral cavity squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 28:896–901. <https://doi.org/10.1002/hed.20423>
59. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005) Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:467–475. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551>
60. Kreppel M, Drebber U, Eich H-T et al (2011) Combined-modality treatment in advanced oral squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol* 187:555–560. <https://doi.org/10.1007/s00066-010-2245-8>
61. Kreppel M, Drebber U, Wedemeyer I et al (2011) Podoplanin expression predicts prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma treated with neoadjuvant radiochemotherapy. *Oral Oncology* 47:873–878. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.06.508>
62. Kreppel M, Krakowezki A, Kreppel B et al (2013) Podoplanin expression in cutaneous head and neck squamous cell carcinoma—prognostic value and clinicopathologic implications. *Journal of Surgical Oncology* 107:376–383. <https://doi.org/10.1002/jso.23238>
63. Kreppel M, Scheer M, Drebber U et al (2010) Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch* 456:473–482. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-0915-7>
64. Krishnan H, Rayes J, Miyashita T et al (2018) Podoplanin: An emerging cancer biomarker and therapeutic target. *Cancer Sci* 109:1292–1299. <https://doi.org/10.1111/cas.13580>
65. Lanzer M, Gander T, Kruse A et al (2014) Influence of histopathologic factors on pattern of metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *The Laryngoscope* 124:E160–E166. <https://doi.org/10.1002/lary.24458>

66. Li Y, Zhou C-X, Gao Y (2015) Moesin regulates the motility of oral cancer cells via MT1-MMP and E-cadherin/p120-catenin adhesion complex. *Oral Oncology* 51:935–943. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.07.003>
67. Li Y-Y, Zhou C-X, Gao Y (2015) Podoplanin promotes the invasion of oral squamous cell carcinoma in coordination with MT1-MMP and Rho GTPases. *Am J Cancer Res* 5:514–529
68. Licitra L, Perrone F, Bossi P et al (2006) High-Risk Human Papillomavirus Affects Prognosis in Patients With Surgically Treated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *JCO* 24:5630–5636. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.6136>
69. Lin S-C, Chang M-F, Chung M-Y et al (2005) Frequent microsatellite alterations of chromosome locus 4q13.1 in oral squamous cell carcinomas. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 34:209–213. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2004.00296.x>
70. Löfstrand J, Chang K-P, Lin JA-J et al (2017) Third Repeat Microvascular Reconstruction in Head and Neck Cancer Patients Aged 65 Years and Older: A Longitudinal and Sequential Analysis. *Scientific Reports* 7:15740. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15948-8>
71. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K (2009) VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 21:154–165. <https://doi.org/10.1016/j.jceb.2008.12.012>
72. Loyo M, Li RJ, Bettgowda C et al (2013) Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head & Neck* 35:454–463. <https://doi.org/10.1002/hed.23100>
73. Machczyński P, Majchrzak E, Niewinski P et al (2020) A review of the 8th edition of the AJCC staging system for oropharyngeal cancer according to HPV status. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 277:2407–2412. <https://doi.org/10.1007/s00405-020-05979-9>
74. Madan R, Brandwein-Gensler M, Schlecht NF et al (2006) Differential tissue and subcellular expression of ERM proteins in normal and malignant tissues: Cytoplasmic ezrin expression has prognostic significance for head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 28:1018–1027. <https://doi.org/10.1002/hed.20435>
75. Margalit DN, Sacco AG, Cooper JS et al (2021) Systematic review of postoperative therapy for resected squamous cell carcinoma of the head and neck: Executive summary of the American Radium Society appropriate use criteria. *Head & Neck* 43:367–391. <https://doi.org/10.1002/hed.26490>
76. Martín-Villar E, Megías D, Castel S et al (2006) Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science* 119:4541–4553. <https://doi.org/10.1242/jcs.03218>
77. Martín-Villar E, Scholl FG, Gamallo C et al (2005) Characterization of human PA2.26 antigen (T1 $\alpha$ -2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *International Journal of Cancer* 113:899–910. <https://doi.org/10.1002/ijc.20656>
78. Martín-Villar E, Yurrita MM, Fernández-Muñoz B et al (2009) Regulation of podoplanin/PA2.26 antigen expression in tumour cells. Involvement of calpain-mediated proteolysis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41:1421–1429. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.12.010>
79. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA (2010) HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology* 11:781–789. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70017-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70017-6)
80. McDermott JD, Bowles DW (2019) Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies. *Curr Treat Options in Oncol* 20:43. <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0650-5>
81. McMahan J, O'Brien CJ, Pathak I et al (2003) Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 41:224–231. [https://doi.org/10.1016/s0266-4356\(03\)00119-0](https://doi.org/10.1016/s0266-4356(03)00119-0)



82. Mello FW, Melo G, Pasetto JJ et al (2019) The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Invest* 23:2849–2859. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02958-1>
83. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F (2015) The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nature Reviews Cancer* 15:371–381. <https://doi.org/10.1038/nrc3947>
84. Mirabello L, Clarke MA, Nelson CW et al (2018) The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v10020080>
85. Mizerska-Kowalska M, Bojarska-Junak A, Jakubowicz-Gil J, Kandefer-Szerszeń M (2016) Neutral endopeptidase (NEP) is differentially involved in biological activities and cell signaling of colon cancer cell lines derived from various stages of tumor development. *Tumour Biol* 37:13355–13368. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5248-y>
86. Moergel M, Meurer P, Ingel K et al (2011) Effectiveness of postoperative radiotherapy in patients with small oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and concomitant ipsilateral singular cervical lymph node metastasis (pN1). *Strahlenther Onkol* 187:337. <https://doi.org/10.1007/s00066-011-2206-x>
87. Muzaffar J, Bari S, Kirtane K, Chung CH (2021) Recent Advances and Future Directions in Clinical Management of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/cancers13020338>
88. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M et al (2000) Alterations of Rb, p16INK4A and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Letters* 160:3–8. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00546-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00546-2)
89. NCCN - National Comprehensive Cancer Network: Head and Neck Cancer Guidelines Detail. <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail>. Zugegriffen: 21. März 2022
90. Neckel N, Michael M, Troeltzsch D et al (2020) Rediscussing the Role of Traditional Risk Factors in Young Adults With Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 40:6987–6995. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14723>
91. Nguyen-Tan PF, Zhang Q, Ang KK et al (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* 32:3858–3867. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.3925>
92. Noronha V, Joshi A, Patil VM et al (2017) Once-a-Week Versus Once-Every-3-Weeks Cisplatin Chemoradiation for Locally Advanced Head and Neck Cancer: A Phase III Randomized Noninferiority Trial. *JCO* 36:1064–1072. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.9457>
93. Ochoa-Alvarez JA, Krishnan H, Pastorino JG et al (2015) Antibody and lectin target podoplanin to inhibit oral squamous carcinoma cell migration and viability by distinct mechanisms. *Oncotarget* 6:9045–9060. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3515>
94. O’Sullivan B, Shah J (2003) New TNM staging criteria for head and neck tumors. *Seminars in Surgical Oncology* 21:30–42. <https://doi.org/10.1002/ssu.10019>
95. Pai SI, Westra WH (2009) Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Annu Rev Pathol* 4:49–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158>
96. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L (2000) Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. *The Lancet* 355:949–955. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)90011-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)90011-4)
97. Quintanilla M, Montero-Montero L, Renart J, Martín-Villar E (2019) Podoplanin in Inflammation and Cancer. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms20030707>
98. Rahadiani N, Ikeda J, Makino T et al (2010) Tumorigenic Role of Podoplanin in Esophageal Squamous-Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol* 17:1311–1323. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0895-5>

99. Ramirez MI, Millien G, Hinds A et al (2003) T1 $\alpha$ , a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. *Developmental Biology* 256:62–73. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00098-2)
100. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ et al (2007) Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *International Journal of Cancer* 120:1731–1738. <https://doi.org/10.1002/ijc.22355>
101. Rishi AK, Joyce-Brady M, Fisher J et al (1995) Cloning, Characterization, and Developmental Expression of a Rat Lung Alveolar Type I Cell Gene in Embryonic Endodermal and Neural Derivatives. *Developmental Biology* 167:294–306. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1024>
102. Rivera C, Oliveira AK, Costa RAP et al (2017) Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral Oncol* 72:38–47. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.07.003>
103. Rodgers LW, Stringer SP, Mendenhall WM et al (1993) Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head Neck* 15:16–19. <https://doi.org/10.1002/hed.2880150104>
104. Roesch Ely M, Nees M, Karsai S et al (2005) Transcript and proteome analysis reveals reduced expression of calgranulins in head and neck squamous cell carcinoma. *European Journal of Cell Biology* 84:431–444. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.01.003>
105. Rosenberg AJ, Vokes EE (2021) Optimizing Treatment De-Escalation in Head and Neck Cancer: Current and Future Perspectives. *The Oncologist* 26:40–48. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2020-0303>
106. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA et al (2005) Up-Regulation of the Lymphatic Marker Podoplanin, a Mucin-Type Transmembrane Glycoprotein, in Human Squamous Cell Carcinomas and Germ Cell Tumors. *The American Journal of Pathology* 166:913–921. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62311-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62311-5)
107. Schacht V, Ramirez MI, Hong Y-K et al (2003) T1 $\alpha$ /podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* 22:3546–3556. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg342>
108. Scheer M, Kübler AC, Manawi NN et al (2005) Endosonographische Darstellung der Tumordicke von oralen Plattenepithelkarzinomen und deren Einfluss auf die Inzidenz von Lymphknotenmetastasen. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9:282–289. <https://doi.org/10.1007/s10006-005-0630-8>
109. 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. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3)
110. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N et al (2016) Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2:1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>
111. Scholl FG (1999) Identification of PA2.26 antigen. *Journal of Cell Science* 112, 4601–4613. <http://jcs.biologist.org/content/joces/112/24/4601.full.pdf>
112. Scholl FG, Gamallo C, Quintanilla M (2000) Ectopic Expression of PA2.26 Antigen in Epidermal Keratinocytes Leads to Destabilization of Adherens Junctions and Malignant Progression. *Laboratory Investigation* 80:1749–1759. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780185>
113. Shao L Identification of hub lncRNAs in head and neck cancer based on weighted gene co-expression network analysis and experiments. *FEBS Open Bio*. <https://doi.org/10.1002/25463.13134>
114. Sheng H, Shao J, Morrow JD et al (1998) Modulation of Apoptosis and Bcl-2 Expression by Prostaglandin E2 in Human Colon Cancer Cells. *Cancer Res* 58:362–366
115. Shibuya M, Claesson-Welsh L (2006) Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research* 312:549–560. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.012>
116. Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN (1994) Dysregulation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Premalignant Lesions during Head and Neck Tumorigenesis. *Cancer Res* 54:3153–3159

117. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2020) Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 70:7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
118. Sinha P, Haughey BH, Kallogjeri D et al (2017) The role of postoperative chemoradiation for oropharyngeal carcinoma: A critical appraisal revisited. *Cancer* 123:887–888. <https://doi.org/10.1002/cncr.30480>
119. Stransky N, Egloff AM, Tward AD et al (2011) The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science* 333:1157–1160. <https://doi.org/10.1126/science.1208130>
120. Sturgis EM, Ang KK (2011) The epidemic of HPV-associated oropharyngeal cancer is here: is it time to change our treatment paradigms? *J Natl Compr Canc Netw* 9:665–673. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2011.0055>
121. Sturgis EM, Cinciripini PM (2007) Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence. *Cancer* 110:1429–1435. <https://doi.org/10.1002/cncr.22963>
122. Subarnbhesaj A, Miyauchi M, Chanbora C et al (2017) Roles of VEGF-Flt-1 signaling in malignant behaviors of oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187092>
123. Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71:209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
124. Szturz P, Cristina V, Herrera Gómez RG et al (2019) Cisplatin Eligibility Issues and Alternative Regimens in Locoregionally Advanced Head and Neck Cancer: Recommendations for Clinical Practice. *Front Oncol*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00464>
125. Szturz P, Wouters K, Kiyota N et al (2017) Weekly Low-Dose Versus Three-Weekly High-Dose Cisplatin for Concurrent Chemoradiation in Locoregionally Advanced Non-Nasopharyngeal Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Aggregate Data. *The Oncologist* 22:1056–1066. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0015>
126. Tanaka F, Yoshimoto S, Okamura K et al (2018) Nuclear PKM2 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma by inducing EMT and post-translationally repressing TGIF2. *Oncotarget* 9:33745–33761. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25850>
127. Tasche KK, Buchakjian MR, Pagedar NA, Sperry SM (2017) Definition of “Close Margin” in Oral Cancer Surgery and Association of Margin Distance With Local Recurrence Rate. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 143:1166–1172. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2017.0548>
128. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK et al (2007) Epidermal Growth Factor Receptor Copy Number Alterations Correlate With Poor Clinical Outcome in Patients With Head and Neck Squamous Cancer. *JCO* 25:2164–2170. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.6605>
129. Thierauf J, Veit JA, Grünow J et al (2016) Expression of Submaxillary Gland Androgen-regulated Protein 3A (SMR3A) in Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck. *Anticancer Res* 36:611–615
130. Thomas N, Krishnapillai R, Bindhu PR, Thomas P (2019) Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in oral squamous cell carcinoma. *Indian Journal of Dental Research* 30:102. [https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR\\_362\\_17](https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_362_17)
131. Thomas Robbins K, Triantafyllou A, Suárez C et al (2019) Surgical margins in head and neck cancer: Intra- and postoperative considerations. *Auris Nasus Larynx* 46:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2018.08.011>
132. Tian S, Switchenko JM, Jhaveri J et al (2019) Survival outcomes by high-risk human papillomavirus status in nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinomas: A propensity-scored analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer* 125:2782–2793. <https://doi.org/10.1002/cncr.32115>
133. Tong Y, Tar M, Melman A, Davies K (2008) The opiorphin gene (ProL1) and its homologues function in erectile physiology. *BJU Int* 102:736–740. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2008.07631.x>
134. Tsujii M, DuBois RN (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83:493–501. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90127-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90127-2)

135. Vecchia CL, Tavani A, Franceschi S et al Epidemiology and Prevention of Oral Cancer. :11
136. de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T et al (2013) Podoplanin expression in oral leukoplakia: Tumorigenic role. *Oral Oncology* 49:598–603. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.02.008>
137. Wang X, Liu M, Zhao CY (2014) Expression of ezrin and moesin related to invasion, metastasis and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Genet Mol Res* 13:8002–8013. <https://doi.org/10.4238/2014.September.29.13>
138. Warburg O (1956) On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123:309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
139. Weckx A, Riekert M, Grandoch A et al (2019) Time to recurrence and patient survival in recurrent oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 94:8–13. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.05.002>
140. WHO World Health Organisations (2020) Cancer Today - International Agency for Research on Cancer. <http://gco.iarc.fr/today/home>. Zugegriffen: 05. März 2022
141. Wicki A, Christofori G (2007) The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer* 96:1–5. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603518>
142. Wicki A, Lehembre F, Wick N et al (2006) Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9:261–272. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.010>
143. Wienecke A, Kraywinkel K (2019) Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. *Onkologie* 25:190–200. <https://doi.org/10.1007/s00761-019-0534-0>
144. Wiest T, Schwarz E, Enders C et al (2002) Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 21:1510–1517. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205214>
145. Wisner A, Dufour E, Messaoudi M et al (2006) Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17979–17984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605865103>
146. Wreesmann VB, Shi W, Thaler HT et al (2004) Identification of Novel Prognosticators of Outcome in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *JCO* 22:3965–3972. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.01.094>
147. Wunschel M, Neumeier M, Utpatel K et al (2021) Staging more important than grading? Evaluation of malignancy grading, depth of invasion, and resection margins in oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Invest* 25:1169–1182. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03421-2>
148. Yuan P, Temam S, El-Naggar A et al (2006) Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 107:563–569. <https://doi.org/10.1002/cncr.22061>
149. Zakeri K, Rotolo F, Lacas B et al (2020) Predictive classifier for intensive treatment of head and neck cancer. *Cancer* 126:5263–5273. <https://doi.org/10.1002/cncr.33212>
150. Zelefsky MJ, Harrison LB, Fass DE et al (1993) Postoperative radiation therapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx: impact of therapy on patients with positive surgical margins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25:17–21. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(93\)90139-m](https://doi.org/10.1016/0360-3016(93)90139-m)
151. Zhang Y, Fakhry C, D'Souza G (2021) Projected Association of Human Papillomavirus Vaccination With Oropharynx Cancer Incidence in the US, 2020–2045. *JAMA Oncology* 7:e212907. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.2907>

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Gesamtüberleben getrennt nach Geschlecht .....	37
Abbildung 2 Gesamtüberleben getrennt nach Patientenalter .....	38
Abbildung 3 Gesamtüberleben getrennt nach Alkoholkonsum .....	39
Abbildung 4 Gesamtüberleben getrennt nach Raucherstatus .....	39
Abbildung 5 Gesamtüberleben getrennt nach HPV-Status .....	40
Abbildung 6 Gesamtüberleben getrennt nach Grad der Differenzierung .....	41
Abbildung 7 Gesamtüberleben getrennt nach T-Stadium Gruppe .....	41
Abbildung 8 Gesamtüberleben getrennt nach N-Stadium Gruppe .....	42
Abbildung 9 Gesamtüberleben getrennt nach N-Stadium .....	42
Abbildung 10 Gesamtüberleben getrennt nach UICC-Stadium Gruppe und UICC-Stadium .....	43
Abbildung 11 Gesamtüberleben getrennt nach Nodalstatus und Extranodalextension .....	44
Abbildung 12 Gesamtüberleben getrennt nach Lymphangiosisstatus .....	45
Abbildung 13 Gesamtüberleben getrennt nach Resektionsstatus .....	45
Abbildung 14 Gesamtüberleben getrennt nach Adjuvantform (links) und Adjuvantstatus (rechts) .....	46
Abbildung 15 Gesamtüberleben getrennt nach Bestrahlungsdosis (RT Dosis) .....	47
Abbildung 16 Gesamtüberleben getrennt nach EGFR-Expression .....	48
Abbildung 17 Gesamtüberleben getrennt nach VEGF2-Expression .....	48
Abbildung 18 Gesamtüberleben getrennt nach Moesin-Expression .....	49
Abbildung 19 Gesamtüberleben getrennt nach PKM2-Expression .....	50
Abbildung 20 Gesamtüberleben getrennt nach COX-2-Expression .....	50
Abbildung 21 Gesamtüberleben getrennt nach Podoplanin-Expression .....	51
Abbildung 22 Gesamtüberleben getrennt nach SMR3A-Expression .....	52
Abbildung 23 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Geschlecht .....	53
Abbildung 24 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Alter .....	54
Abbildung 25 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Alkoholkonsum .....	55
Abbildung 26 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Raucherstatus .....	55
Abbildung 27 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach HPV-Status .....	56
Abbildung 28 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Grad der Differenzierung .....	57
Abbildung 29 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach T-Stadium Gruppe .....	57
Abbildung 30 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach N-Stadium Gruppe .....	58
Abbildung 31 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach UICC-Stadium Gruppe und UICC-Stadium .....	59
Abbildung 32 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Nodalstatus/ Extranodalextension .....	60
Abbildung 33 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Lymphangiosisstatus .....	60
Abbildung 34 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Resektionsstatus .....	61
Abbildung 35 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Adjuvantform .....	62
Abbildung 36 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Bestrahlungsdosis (RT-Dosis) .....	62
Abbildung 37 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach EGFR-Expression .....	63
Abbildung 38 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach VEGF2-Expression .....	64
Abbildung 39 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Moesin-Expression .....	65
Abbildung 40 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach PKM2-Expression .....	66
Abbildung 41 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach COX-2-Expression .....	66
Abbildung 42 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach Podoplanin-Expression .....	67
Abbildung 43 Erkrankungsfreies Überleben getrennt nach SMR3A-Expression .....	68

### 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einteilung der Podoplanin-Expressionsgrade .....	23
Tabelle 2: Altersverteilung Gesamtkollektiv .....	27
Tabelle 3: Tumorlokalisation des Primarius .....	27
Tabelle 4: UICC-Stadien des Gesamtkollektives analog der 6. Auflage .....	29
Tabelle 5: Histopathologische Befunde des Gesamt- und SMR3A Subkollektivs .....	31
Tabelle 6: Übersicht Adjuvante Therapie .....	32
Tabelle 7: Übersicht Radiotherapiedosierung .....	33
Tabelle 8: Expressionsverhalten von Tumormarkern im SMR3A Kollektiv .....	34
Tabelle 9: UICC-Stadien des SMR3A Kollektivs (6. Edition) .....	36
Tabelle 10: Multiple Lineare Regressionsanalyse für den Endpunkt Gesamtüberleben .....	52
Tabelle 11: Multiple Lineare Regressionsanalyse für den Endpunkt Erkrankungsfreies Überleben .....	68

## 9 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Kreppel M, Scheer M, Drebber U, Ritter L, Zöller J (2010)

Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch* 456:473–482. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-0915-7>

Kreppel M, Backhaus T, Akuamo-Boateng D, Scheer M, Nickenig HJ, Zöller J, Rothammel D (2014)

Epitheliale Vorläuferläsionen - Differentialdiagnostik, Entartungspotential und Therapie. *Oralchirurgie Journal* 3/2014, ISSN 1617-7843, p. 6-15 <https://www.zwp-online.info/fachgebiete/oralchirurgie/diagnostik/epitheliale-vorlaeufelaesionen-diagnostik-und-therapie> (Zugegriffen 10. März 2022)