

Aus der Hals-, Nasen-, Ohren-Klinik und Poliklinik - Plastische Operationen  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die klinische Relevanz des Vitamin D Rezeptors im Kopf-Hals-  
Plattenepithelkarzinom

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Lara Salzer  
aus Bad Dürkheim

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 30.04.2025

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung .....	1
2 Literaturdiskussion .....	3
2.1 Krebserkrankungen .....	3
2.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-, Halsbereichs - Epidemiologie, Diagnostik und Therapie .....	5
2.2.1 Entstehung der Kopf-, Halstumore auf genetischer Ebene.....	10
2.3 Nukleäre Rezeptoren.....	12
2.3.1 Nukleäre Rezeptoren in Krebs .....	13
2.3.2 Der Vitamin D Rezeptor .....	14
2.3.3 Der Vitamin D Rezeptor in Bezug auf Krebs .....	15
2.3.4 Der Vitamin D Rezeptor in HNSCC.....	17
2.4 Der Ligand Vitamin D.....	19
2.4.1 Vitamin D und Krebs .....	20
2.4.3 Molekulare Wirkmechanismen von Vitamin D .....	21
2.5 Thesen .....	23
3 Material und Methoden.....	24
3.1 Generierung eines Patientenkollektivs.....	24
3.2 Grundprinzip der Immunhistochemie .....	25
3.2.1 Ki67-, Taspase1- und VDR-Färbung.....	25
3.2.2. HE-Färbung .....	26
3.3 Untersuchungsmaterial.....	27
3.3.1 Gewebeprozessierung .....	27
3.3.2 Tissue Microarray (TMA).....	28
3.4 QuPath .....	29
3.4.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	29

3.4.2 Referenzgewebe gesunder Probanden.....	30
3.5 statistische Auswertung.....	31
4 Ergebnisse.....	32
4.1 Klinische Daten der TMAs.....	32
4.1.1 Demografische Angaben.....	32
4.1.2 Lokalisation des Primärtumors.....	33
4.1.3 Rezidive.....	34
4.1.4 TNM-Klassifikation und UICC-Stadium.....	34
4.1.5 p16 Status.....	36
4.1.6 Therapie.....	37
4.1.7 Überlebenszeiten.....	38
4.2 Deskriptive Analyse der (immun)histochemischen Ergebnisse.....	41
4.2.1 Unterschiede und Korrelationen zwischen VDR-, Ki67- und Taspase1-Expression und klinischen Daten.....	45
4.2.2 Korrelation zwischen der VDR-, Ki67- und Taspase1- Expression.....	49
4.2.3 Überlebenswahrscheinlichkeiten.....	50
4.3 Überlebenswahrscheinlichkeiten.....	56
4.3.1 Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf VDR.....	56
4.3.2 Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf Ki67.....	61
4.3.3 Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf Taspase1.....	68
4.4 Krankheitsfreies Überleben.....	71
4.4.1 Krankheitsfreies Überleben in Bezug auf VDR.....	71
4.4.2 Krankheitsfreies Überleben in Bezug auf Ki67.....	75
4.4.3 Krankheitsfreies Überleben in Bezug auf Taspase1.....	77
4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	80
5 Diskussion.....	82
5.1 Evaluation von Material und Methoden.....	82
5.1.1 Die Repräsentativität des Patientenkollektivs.....	82
5.1.2 Immunhistochemische Färbungen der TMAs.....	83
5.1.3 Auswertungen der Färbungen mittels QuPath.....	83

5.1.4 Der Einfluss der Zellzahl auf die Auswertung .....	84
5.1.5 Der Einfluss der Mehrfachfärbung des Gewebes .....	84
5.1.6 Abschließende Bewertung von Material und Methoden .....	85
5.1.7 Allgemeine Einschränkung der Studie.....	85
5.2 VDR-Expression in Tumorzellen.....	87
5.2.1 Detektion des VDR in Gewebe .....	87
5.2.2 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich der Overall Survival.....	87
5.2.3 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich des krankheitsfreien Überlebens.....	88
5.3 Ki67-Expression in Tumorzellen .....	90
5.3.1 Detektion des Ki67 im Gewebe.....	90
5.3.2 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich der Overall Survival.....	90
5.3.3 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich des krankheitsfreien Überlebens.....	91
5.4 Taspase1-Detektion in Tumorzellen .....	93
5.4.1 Detektion der Taspase1 im Gewebe .....	93
5.4.2 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich der Overall Survival.....	93
5.4.3 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich der Disease Free Survival.....	94
5.5 Korrelation zwischen der Ki67-, Taspase1- und VDR-Expression.....	95
5.6 Abschließende Beurteilung der Thesen .....	96
6 Zusammenfassung.....	97
7 Literaturverzeichnis .....	XI
8 Anhang.....	XVI
Anhangsverzeichnis .....	XVI
A Anhänge für den Ergebnisteil .....	XVI
9 Danksagung .....	XVII
10 Eigenständigkeitserklärung.....	XVIII
11 Lebenslauf.....	XIX

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

AF-2: Aktivierungsfunktion-2

AR: Androgenrezeptor

bzw.: beziehungsweise

COX-2: Cyclooxygenase-2

CT: Computertomografie

DFS: Disease Free Survival

DNA: Desoxyribonukleinsäure

EGFR: epidermal growth factor receptor

ER: estrogen receptor

HE: Hämatoxylin Eosin

HNO: Hals-, Nasen-, Ohren-,

HNC: Head- and Neck Cancer

HNSCC: Head- and Neck Squamosa Cell Carcinoma

HPV: humanes Papillomavirus

IE: internationale Einheiten

kb: Kilobase

KWT: Kruskal-Wallis-Test

LNR: Lymphnode Ratio

MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MLL: Mixed-Lineage Leukemia

MRT: Magnetresonanztomografie

mTOR: mammalian Target of Rapamycin

mVDR: Membran Vitamin D Rezeptor

NFκB: Nuklearfaktor kappa B

nVDR: nuklearer Vitamin D Rezeptor

OP: Operation

OS: Overall Survival

OSCC: oral squamous cell carcinoma

p: p-Wert

PET: Positronenemissionstomographie

PPAR: Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren

py: pack years

RAR: Retinoid-Säure-Rezeptor

RB: Retinoblastom-Tumorsuppressor

RCT: Radiochemotherapie

RXR: Retinoid-X-Rezeptor

SCC: Squamous cell carcinoma

Tab.: Tabelle

Taspase1: Threonin-Aspartase 1

TNM: Tumor Node Metastases

TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan

UICC: Union internationale contre le cancer

UV: ultraviolett

VDR: Vitamin D Rezeptor

VDRE: Vitamin D response element

VitD: Vitamin D

WHO: Weltgesundheitsorganisation

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich der relativen 5-10-Jahres-Überlebensrate nach Lokalisation und Geschlecht, Deutschland 2017-2018 (periodenweise) [6] .....	3
Abbildung 2: TNM-Klassifikation, Stand 2023,[19] .....	7
Abbildung 3: Altersverteilung männlicher und weiblicher Fälle .....	32
Abbildung 4: Lokalisation des Primärtumors in Bezug auf das Geschlecht .....	34
Abbildung 5: Einteilung des Kollektivs in die zugehörigen UICC-Stadien (8.Edition).....	35
Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung des HPV-Status des Patientenkollektivs.....	37
Abbildung 7: Overall Survival nach Erstdiagnose eines HNSCC .....	39
Abbildung 8: Disease Free Survival nach Erstdiagnose eines HNSCC.....	40
Abbildung 9: Expressionsmuster der immunhistochemisch gefärbten TMA .....	41
Abbildung 10: deskriptive Statistik der Färbungen .....	43
Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung des H-Scores der VDR-Färbung .....	43
Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung des H-Scores der Ki67-Färbung.....	44
Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der H-Scores der Taspase1-Färbung .....	44
Abbildung 14: Expression von VDR in HNSCC Tumoren in Relation zu dem HPV-Status....	45
Abbildung 15: Expression von VDR in HNSCC Tumoren in Zusammenhang mit dem UICC-Stadium.....	46
Abbildung 16: Expression von Taspase1 in HNSCC Tumoren in Zusammenhang mit dem UICC-Stadium.....	46
Abbildung 17: Expression von VDR in HNSCC Tumoren in Zusammenhang mit den Therapieoptionen .....	47
Abbildung 18: Expression von VDR in HNSCC Tumoren in Zusammenhang mit dem N-Stadium.....	47
Abbildung 19: Expression von Taspase1 in HNSCC Tumoren in Zusammenhang mit der Lokalisation .....	48
Abbildung 20: Korrelation zwischen VDR- und Taspase1-Expression. ....	49
Abbildung 21: Overall Survival in Abhängigkeit des UICC-Stadiums .....	50
Abbildung 22: Overall Survival in Abhängigkeit des T-Stadiums.....	51
Abbildung 23: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums .....	51
Abbildung 24: Overall Survival in Abhängigkeit der Lokalisation.....	52
Abbildung 25: Overall Survival in Abhängigkeit des Rezidivdaseins .....	53
Abbildung 26: Overall Survival in Abhängigkeit der Therapieoptionen.....	54
Abbildung 27: Overall Survival in Abhängigkeit des H-Scores der VDR-Färbung .....	54
Abbildung 28: Overall Survival des H-Scores der Ki67-Färbung.....	55
Abbildung 29: Overall Survival des H-Scores der Taspase1-Färbung .....	55

Abbildung 30: Overall Survival in Abhängigkeit des UICC-Stadiums bei einer geringen VDR-Expression .....	57
Abbildung 31: Overall Survival in Abhängigkeit des T-Stadiums bei einer geringen VDR-Expression .....	57
Abbildung 32: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums bei einer geringen VDR-Expression .....	58
Abbildung 33: Overall Survival in Abhängigkeit des Nikotinabusus bei einer hohen VDR-Expression .....	58
Abbildung 34: Overall Survival in Abhängigkeit des Geschlechts in Zusammenhang mit einer hohen VDR-Expression.....	59
Abbildung 35: Overall Survival in Abhängigkeit von der Lokalisation und einer geringen Expression an VDR.....	60
Abbildung 36: Overall Survival in Abhängigkeit der Lokalisation und einer hohen Expression an VDR .....	60
Abbildung 37: Overall Survival in Abhängigkeit der Therapieoptionen in Zusammenhang zu einer hohen VDR-Expression.....	61
Abbildung 38: Overall Survival in Abhängigkeit des UICC-Stadiums und einer hohen Expression von Ki67 .....	62
Abbildung 39: Overall Survival in Abhängigkeit des T-Stadiums in Zusammenhang mit einer geringen Ki67-Expression .....	62
Abbildung 40: Overall Survival in Zusammenhang mit einer hohen Ki67-Expression .....	63
Abbildung 41: Overall Survival in Zusammenhang mit dem N-stadium und einer geringen Expression an Ki67 .....	63
Abbildung 42: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums in Zusammenhang mit einer geringen Expression von Ki67.....	64
Abbildung 43: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums in Zusammenhang mit einer hohen Expression von Ki67.....	64
Abbildung 44: Overall Survival in Abhängigkeit des Nikotinkonsums und einer hohen Expression von Ki67 .....	65
Abbildung 45: Overall Survival in Abhängigkeit des Geschlechts in Zusammenhang mit einer hohen Expression von Ki67.....	66
Abbildung 46: Overall Survival in Abhängigkeit der Lokalisation in Zusammenhang mit einer niedrigen Expression von Ki67 .....	66
Abbildung 47: Overall Survival in Abhängigkeit der Lokalisation in Zusammenhang mit einer hohen Ki67 Expression .....	67
Abbildung 48: Overall Survival in Abhängigkeit der Therapieoptionen in Zusammenhang mit einer hohen Expression an Ki67.....	67

Abbildung 49: Overall Survival in Abhängigkeit von dem Grading und einer geringen Taspase1-Expression .....	68
Abbildung 50: Overall Survival in Abhängigkeit des UICC-Stadiums bei einer geringen Taspase1-Expression .....	69
Abbildung 51: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums in Bezug auf eine geringe Taspase1-Expression .....	69
Abbildung 52: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums in Bezug zu einer hohen Taspase1-Expression .....	70
Abbildung 53: Overall Survival in Abhängigkeit des Geschlechts in Zusammenhang mit einer hohen Taspase1-Expression.....	70
Abbildung 54: DFS in Abhängigkeit des T-Stadiums in Zusammenhang mit einer geringen Expression von VDR.....	71
Abbildung 55: DFS in Abhängigkeit des T-Stadiums und einer hohen Expression von VDR	72
Abbildung 56: DFS in Abhängigkeit des N-Stadiums in Zusammenhang mit einer geringen Expression von VDR.....	72
Abbildung 57: DFS in Abhängigkeit des N-Stadiums in Zusammenhang mit einer hohen Expression von VDR.....	73
Abbildung 58: DFS in Abhängigkeit des M-Stadiums in Zusammenhang mit einer hohen Expression an VDR.....	73
Abbildung 59: DFS in Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum und einer geringen Expression von VDR.....	74
Abbildung 60: DFS in Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum und einer hohen Expression von VDR .....	74
Abbildung 61: DFS in Zusammenhang mit dem N-Stadium und einer geringen Expression von Ki67 .....	75
Abbildung 62: DFS in Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum und einer hohen Expression von Ki67 .....	76
Abbildung 63: DFS in Zusammenhang mit dem Nikotinkonsum und einer geringen Expression von Ki67 .....	76
Abbildung 64: DFS in Zusammenhang mit dem Nikotinkonsum und einer hohen Expression von Ki67 .....	77
Abbildung 65: DFS in Zusammenhang mit dem N-Stadium und einer hohen Expression an Taspase1 .....	78
Abbildung 66: DFS in Zusammenhang mit dem Nikotinkonsum und einer hohen Expression von Taspase1 .....	78
Abbildung 67: DFS in Zusammenhang mit der Lokalisation und einer geringen Expression an Taspase1 .....	79

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nikotin- und Alkoholkonsum der Probanden .....	33
Tabelle 3: Einteilung der Primärtumore anhand der TNM-Stadien.....	35
Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung histopathologischer Parameter .....	36
Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung verfolgter Therapiekonzepte, RCT= Radiochemotherapie, OP= Operation.....	38
Tabelle 6: Expressionslevel aller TMA-Proben .....	41
Tabelle 7: Expression der VDR-Färbung .....	42
Tabelle 8: Expression der Ki67-Expression .....	42
Tabelle 9: Expression der Ki67-Expression .....	42
Tabelle 10: Deskriptive Statistik bezüglich der H-Scores der Antikörper.....	42
Tabelle 11: Ergebnisse der Korrelationsanalysen zwischen VDR, Ki67 und Taspase1.....	49

# 1 Einleitung

Im Jahr 2018 erkrankten 497900 Menschen in Deutschland an Krebs, wovon 14.310 Fälle auf Mundhöhlen- und Rachenkrebs entfielen. An diesen Zahlen lässt sich der Stellenwert, den Krebs im klinischen Alltag und in der Forschung einnimmt, erkennen. Diese Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit Plattenepithelkarzinomen (SCC), welche 84% der Krebserkrankungen im Mund- und Rachenbereich ausmachen. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Frauen 62% und bei Männern dahingegen 52%. Dieser Unterschied erklärt sich durch die Risikofaktoren, welche zu Plattenepithelkarzinomen führen. Hierzu zählen regelmäßiger Tabak- und Alkoholkonsum, welcher bei dem weiblichen Geschlecht weniger stark ausgeprägt ist als bei dem männlichen. Zudem gilt das humane Papillomavirus (HPV) als Auslöser eines Tumors im Mundrachenbereich. Epstein-Barr-Viren und das Verzehren von Nitrosaminen stehen im Zusammenhang mit dem Risiko an einem Nasenrachenkarzinom zu erkranken. Neben den genannten Risikofaktoren ist die Prognose abhängig von weiteren Aspekten, wie dem Lymphknotenstatus, dem Ort des Primärtumors, und dem UICC-Stadium [1].

Eine Störung der zellulären Signalübertragung durch nukleare Rezeptoren trägt zu einer Vielzahl von malignen Erkrankungen bei, so auch Krebs. In der Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehört der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) zu den Mitgliedern, für die bereits antitumorale Wirkungen vorgeschlagen wurden [2]. Dieser Rezeptor kontrolliert die Transkription von einer Vielzahl von Zielgenen im Nukleus und steuert somit unterschiedliche Zellprozesse [3]

Bei dem dazugehörigen Liganden handelt es sich um Vitamin D, einem fettlöslichen Vitamin, welches hauptsächlich durch die körpereigene Biosynthese als Reaktion auf ultraviolette Sonnenstrahlen gewonnen wird, aber auch durch Lebensmittel aufgenommen werden kann. Dieses durchläuft die Leber und die Nieren und wird auf diesem Weg in die biologisch aktive Form Calcitriol umgewandelt. Durch die Bindung an den Vitamin D Rezeptor kann Vitamin D den Calcium- und Phosphathaushalt regulieren und somit das Knochenwachstum beeinflussen [4].

Ein Mangel an Vitamin D kann zu unterschiedlichen Erkrankungen führen, dazu zählt-, neben Osteoporose und Rachitis bei Kindern-, auch Krebs. So gibt es einige Tumor-relevante Studien, welche sich mit der Wirkung von Vitamin D und der Expression von VDR beschäftigen, jedoch beziehen diese sich vor allem auf Brust-, sowie Darmkrebs. Zudem ist zwar bekannt, dass Vitamin D und VDR die Pathologie, Prognose und Therapieerfolg von Tumoren beeinflussen können, jedoch ist der molekulare Hintergrund nur im Ansatz

verstanden. Insbesondere ist bisher die Rolle von Vitamin D/ VDR in Kopf-, Hals-Tumoren nur im Ansatz verstanden [5].

In dieser Arbeit wurden in Kooperation mit dem Institut für allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz bereits gefärbte Schnitte bereitgestellt, welche im Anschluss auf die VDR-Expression hin mit Hilfe der Opensource Software „QuPath“ untersucht wurden. Darüber hinaus wurden die gesammelten klinischen Daten der Patienten, unter Einbeziehung der Expressionsanalysen, statistisch ausgewertet.

Ziel dieser Dissertation ist somit die vergleichende Expressions-Analyse des Vitamin D Rezeptors in Kopf-, Hals-Plattenepithelkarzinomen, sowie die Beurteilung von dessen klinischer Relevanz. Anhand der (immun)histologischen Untersuchung von Tumormaterial (u.a. *Tumor-Micro-Arrays* TMAs) und den dazugehörigen klinischen Patientendaten sollen Rückschlüsse auf die prognostische Relevanz des VDR gezogen werden.

Stellt sich ein Zusammenhang zwischen der VDR-Expression und dem Vorkommen von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich dar, so können patho-physiologische Auswirkungen erfasst und die Rolle des VDR als therapeutisches Target diskutiert werden.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Krebserkrankungen

Laut Robert Koch Institut erkrankten allein im Jahr 2018 265.200 Männer und 232.700 Frauen an Krebs. Relevant ist zudem die 5-Jahres-Überlebensrate, welche abhängig von der Krebsart ist [6]. So hat die Bauchspeicheldrüse beispielsweise eine geringe 5-Jahres-Überlebensrate mit 20%, wohingegen bei Schilddrüsenkrebs diese Rate bei 90% liegt (Abb. 1).

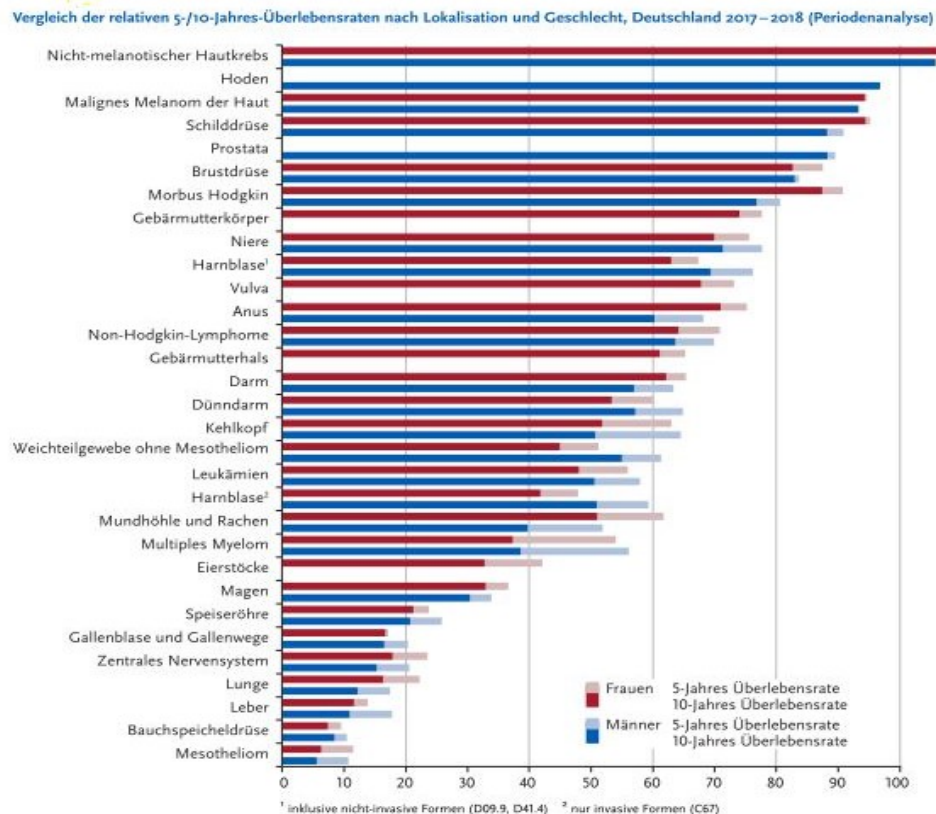


Abbildung 1: Vergleich der relativen 5-10-Jahres-Überlebensrate nach Lokalisation und Geschlecht, Deutschland 2017-2018 (periodenweise) [6]

Da bisher nicht alle Ätiologien bekannt sind, lassen sich nur solche Tumore behandeln, deren Ätiologie in Erfahrung gebracht werden kann.

Durch präventive Maßnahmen lassen sich laut WHO geschätzt 30-50 aller Tumorerkrankungen verhindern. Das Deutsche Krebsforschungszentrum schätzt dies für Deutschland auf 37%.

Neben den allgemein bekannten Krebsrisiken wie Tabak- und Alkoholkonsum gibt es noch weitere Risikofaktoren für die Entstehung von Krebs. Dazu gehören Übergewicht und der häufig damit einhergehende Bewegungsmangel, Stoffwechselerkrankungen, eine einseitige

Ernährung, UV-Strahlung, chronische Infektionen und die Belastung mit Schadstoffen, wie beispielsweise Asbest. Als unvermeidbare Risikofaktoren gelten genetische Veränderungen und das Alter des Patienten.

Da es über 100 Arten von Krebs gibt, ist es sinnvoll ihn in verschiedene Kategorien einzuteilen. Dazu zählen Karzinom, Sarkom, Myelom, Melanom, Lymphom, Leukämie und Tumore, die das Gehirn sowie die Wirbelsäule betreffen. Karzinome können zudem noch weiter unterteilt werden in Deckzell-, Adeno-, Basalzell- und Plattenepithelkarzinome [7].

Allen Krebsarten sind die sechs Kennzeichen des Krebses (zu Englisch: „hallmarks of cancer“), welche zuerst von Hanahan und Weinberg beschrieben wurden, gemeinsam. Zu diesen Charakteristika gehören anhaltende Wachstumssignale, das Verhindern des Zelltodes, das Ausweichen von Wachstumshemmern, das Fördern der Angiogenese, die Aktivierung von Metastasierung und Invasion sowie die Möglichkeit die Immortalität an weitere Tumorzellen weiterzugeben. Zehn Jahre später wurde diese Liste dann durch vier weitere Merkmale ergänzt [8]. Dazu zählen die genomische Stabilität und Mutationen, die Tumor fördernde Inflammation, das Verhindern des Zelluntergangs durch das Immunsystem und das Reprogrammieren des Zellstoffwechsels [7].

Diesen Kennzeichen geht eine Mutation voran, welche schlussendlich zu dem Entstehen des Krebses führt. Hier müssen zwei Wege unterschieden werden. Während bei einigen Zellen die Proliferationsrate ansteigt und somit die Anzahl der mutierten Zellen wächst, besagt der zweite Weg, dass die Gesamtmutationsrate durch die gestörte Stabilität des Genoms erhöht werden kann [9].

## **2.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-, Halsbereichs - Epidemiologie, Diagnostik und Therapie**

Jährlich gibt es geschätzt 9-10 Neuerkrankungen in Form von Mundhöhlenkrebs pro 100.00 Einwohner allein in Deutschland. Das Plattenepithelkarzinom tritt vor allem in der sechsten Lebensdekade auf und ist mit 95 % die am meisten vorkommende Krebsart in dem Mundraum. Im Jahr 2019 erlagen 3888 Männer und 1479 Frauen dieser Erkrankung. Die absolute 5-jahres-Überlebensrate liegt bei Frauen bei 40% und bei Männern bei 31% [6]. Das Krebsregister des Bundeslandes Rheinland-Pfalz, dem Mainz als Landeshauptstadt und somit auch die Universitätsmedizin zugeordnet ist, veröffentlichte in dem Jahresbericht 2020/ 21, dass Mundhöhlen- und Rachentumore die zehnt häufigsten Krebserkrankungen unter Männern sind [10]. Im Jahr 2018 verstarben in Rheinland-Pfalz 87 Männer und 47 Frauen an Tumoren, welche die Mundhöhle betrafen.

Ein erhöhtes Lebensalter und eine schlechte Mundhygiene gelten bei dem Plattenepithelkarzinom als Risikofaktoren [11]. Insbesondere das Rauchen von über 20 Zigaretten pro Tag und der Genuss von hochprozentigen Spirituosen gelten als kanzerogen. Zu den kanzerogenen Stoffen zählt auch die Betelnuss, welche vornehmlich in Südasien gekaut wird [12]. Hinzukommen bei den Tumoren des Zungengrundes die HP-Viren als Auslöser [11] während Lippenkrebs häufig von UV-Strahlen ausgelöst wird [13]. 25% aller Kopf- und Halsplattenepithelkarzinome belaufen sich auf die zuvor erwähnten HP-Viren. Da es sich bei diesem Erreger um eine sexuell übertragbare Infektion handelt, beeinflusst die Wahl der Sexualpartner und die Häufigkeit des Wechsels der Geschlechtspartner das Risiko an einem SCC („squamosa cell carcinoma“) zu erkranken. Insgesamt sind 24 HPV-Typen mit benignen Tumoren assoziiert, während 12 HPV-Typen mit malignen Veränderungen in Verbindung gebracht werden. Am häufigsten ist der HPV 16 Subtyp zu finden, welcher ebenfalls maligne Läsionen hervorruft. Im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren besitzen die Läsionen, welche HPV induziert sind, eine bessere Prognose, jedoch ist der Hintergrund dazu unklar [14].

Das SCC besitzt je nach Lokalisation unterschiedliche Prädispositionsstellen. Hierunter fallen die Zunge und der Mundboden in der Mundhöhle sowie die Tonsillen und die Zungenbasis in dem Oropharynx. Ein SCC findet sich auch häufig auf den Lippen, dem Kehlkopf und dem Hypopharynx [12].

Die Symptome unterscheiden sich je nach Lokalisation des Tumors. Handelt es sich um eine Krebserkrankung der Mundhöhle, so äußert sich dies unter anderem durch eine nicht heilende Ulzeration, Schmerzen, Blutungen oder einer Okklusionsstörung. Häufig geht dies auch einer Leukoplakie oder eine Erythroplakie voraus, welcher einer engmaschigen Kontrolle

unterliegen sollte. Oropharyngeale Karzinome äußern sich dahingegen anderweitig und die Symptome sind zudem stark abhängig von der Lokalisation des Tumors. Tumore des Gaumens können häufig frühzeitig diagnostiziert werden, da sie bereits zu einem frühen Zeitpunkt durch ein auffälliges Wachstum auf sich aufmerksam machen. Befindet sich ein Tumor am Zungengrund, so wird er häufig später diagnostiziert, da diese Stelle zum einen relativ schmerzunempfindlich ist und zum anderen schwieriger begutachtet werden kann. Jedoch kann es zu einer Dysphagie, Otalgie und einer Stimmveränderung kommen. Sind die Tonsillen betroffen, so äußert sich dies durch Schmerzen, Halsschmerzen, Dysphagie und Trismus. [15, 16]

Jene Art der Tumore kann mittels Palpation und dem HNO-Status diagnostiziert werden. Zusätzlich erfolgt eine Blutuntersuchung, bei welcher insbesondere auf das Vorhandensein von HP-Viren geachtet wird. Zu Beginn wird auch eine Panendoskopie durchgeführt, welche ein Zweitkarzinom ausschließen soll. Darüber hinaus gibt es verschiedene bildgebende Verfahren wie das Röntgen, die Sonografie, CT, MRT oder PET. Zudem erfolgt eine Biopsie, bei welcher eine Gewebeprobe entnommen wird und in einem Labor histologisch untersucht wird [11, 16].

Im Verlauf der Diagnose kommt es zur Einteilung nach dem TNM-System (Abb. 2), welches 1987 aus der Vereinigung des AJCC und des UICC Systems hervorging [17]. Der Buchstabe „T“ steht für „primärer Tumor“ und beschreibt die Ausdehnung und die Größe des Tumors. „N“ beschreibt die regionalen, infiltrierten Lymphnoten. Der letzte Buchstabe „M“ gibt an ob Fernmetastasen vorhanden sind. Hinzu kommen einige Präfixe, die den Tumor noch weiter klassifizieren. Der kleine Buchstabe „m“ bedeutet, dass in einem Organ mehrere Tumore vorhanden sind wohingegen „r“ angibt, dass es sich um ein Rezidiv handelt. Bei der klinischen Klassifikation ist zudem der Buchstabe „c“ von Bedeutung, mit welchem die Diagnosesicherheit fakultativ angegeben werden kann [18].

Classification	Thickness	Ulceration/Mitoses
T1	≤ 1.00 mm	a: no ulceration, mitoses < 1/mm <sup>2</sup> b: ulceration and/or mitoses ≥ 1/mm <sup>2</sup>
T2	1.01–2.00 mm	a: without ulceration b: with ulceration
T3	2.01–4.00 mm	a: without ulceration b: with ulceration
T4	> 4.00 mm	a: without ulceration b: with ulceration

Classification	No. of Positive Nodes	Nodal Burden
N0	0	
N1	1	a: micrometastases b: macrometastases
N2	2–3	a: micrometastases b: macrometastases c: in-transit metastases or satellite lesions without metastatic nodes
N3	4+	Or in-transit metastases or satellite lesions with any number of metastatic nodes

Classification	Site	Serum LDH
M0	None	NA
M1	Distant skin, subcutaneous, or nodes	Normal
M2	Lung	Normal
M3	All other visceral metastases	Elevated

Abbildung 2: TNM-Klassifikation, Stand 2023.[19]

Aus dem TNM-System ergibt sich wiederum die UICC-Einteilung, welche aus 5 Stadien besteht. Stadium 0 umfasst kleine Tumore in einem frühen Stadium ohne den Befall von Lymphknoten und ohne Ausbildung von Fernmetastasen. Stadium I umfasst T1 und T2 Tumore, mit einer N1 Bewertung und ohne das Vorkommen von Fernmetastasen. Tumore mit einer Wertung von T4, Lymphknoten mit einer Einteilung von bis einschließlich N2 und das Fehlen von Fernmetastasen beschreibt Stadium II. Das dritte Stadium umfasst Tumore mit der Einteilung T4 und jede Einteilung der Lymphknoten. Auch hier fehlen Fernmetastasen. Stadium IV wird in drei Subgruppen unterteilt. Stadium IVA umfasst T1 bis T3a, N0 und M0. Das gleiche gilt für Stadium IVB, lediglich mit dem Unterschied, dass die Lymphknoten die Wertung N1 tragen. Bei Stadium IVC ist jede Einteilung der Tumore und Lymphknoten denkbar. Zusätzlich kommen hier Fernmetastasen vor [20].

Insbesondere bei Plattenepithelkarzinomen ist das Grading zusätzlich zu der TNM-Klassifikation von großer Bedeutung, welches von der histomorphologischen Differenzierung des Tumors abhängt. Die Einteilung erfolgt in gut, mäßig und schlecht differenziert und erfolgt als Blickdiagnose, wodurch das Grading subjektiv und abhängig von dem betrachtenden Pathologen ist. Generell kommt es bei Plattenepithelkarzinomen zu einer Verkleinerung der Zellkerne bei gleichzeitiger Zunahme des Zytoplasmas. Es wird verstärkt Zytokeratin gebildet, was zu einer Ausbildung von Hornperlen führt. Große Nester an Keratin finden sich in gut differenzierten malignen Läsionen. Mäßig differenzierte Plattenepithelkarzinome zeichnen sich durch eine moderate Anzahl an Mitosen und kleineren Nestern mit Hornperlen aus. Zudem ist der Grad der Differenzierung geringer als bei gut differenzierten Tumorzellen. Die meisten Mitosen finden sich bei schlecht differenzierten Tumoren. Zusätzlich kommen hier anaplastische, pleomorphe Zellen vor. Im Vergleich zu den beiden anderen Differenzierungsgraden erscheinen die Tumorgrenzen zackig [21, 22].

Die Therapie ist hierbei abhängig von dem Stadium der Erkrankung. Ist der Tumor bis zu 4cm groß und hat weder Lymphknoten befallen noch Metastasen gebildet, so ist eine Operation ohne Nachbehandlung indiziert. Wenn der Tumor fortgeschritten ist, aber dennoch keine Metastasen entwickelt hat, so erfolgt zusätzlich zu einer Operation eine adjuvante Strahlentherapie bzw. eine Chemotherapie.

Sollte sich der Tumor als inoperabel ohne Metastasen darstellen, so wird eine regionäre Chemotherapie mit Cis-platin und 5-Flourouracil oder eine Strahlentherapie mit Cetuximab durchgeführt. Bei einer Erkrankung mit Metastasierung erfolgt eine Chemotherapie mit Cetuximab.

Generell ist die Möglichkeit eine Operation durchzuführen nicht nur abhängig von dem TNM-Stadium sondern auch von weiteren Faktoren wie dem Allgemeinzustand, der Compliance und weiteren Erkrankungen des Patienten [23]. Demnach muss vor einer möglichen Operation eine Risikoanalyse durchgeführt werden. Hierbei wird das betroffene Organ und dessen Funktionen anhand von einzelnen Parametern untersucht und einem Risiko-Score zugeteilt. Dieser ermöglicht es den behandelnden Ärzten das Risiko, welches eine Operation mit sich bringen würde, abzuschätzen [24].

In einigen Fällen erscheint das tumorumgebende Gewebe für den Betrachter gesund, allerdings können sich dort histologisch auch Dysplasien befinden. Wird dieses Gewebe nicht entfernt, so kann es zu Rezidiven kommen, dies kommt bei 10-30% der operierten HNSCC („head and neck squamosa cell carcinoma“) vor [25].

Der Befall der Lymphknoten ist insbesondere bei Oropharynx betreffenden Karzinomen gut vorhersagbar. Zunächst sind die parajugulären Lymphknoten befallen und weitet sich

anschließend von superior nach inferior aus [26]. In vielen Fällen wird zusätzlich eine Neck Dissection, also eine Ausräumung der Lymphknoten, durchgeführt. Diese kann in vier Typen, abhängig von den entfernten anatomischen und lymphatischen Strukturen unterteilt werden. Relevant sind hierfür sechs Lymphknotenlevel. Das erste Lymphknotenlevel lässt sich in zwei Sublevel unterteilen. Level IA beschreibt die submentale Region wohingegen Level IB sich auf die submandibular Region bezieht. Zur genaueren Orientierung eignen sich der Mandibularwinkel, die Protuberantia mentalis und der Hyoidknochen. Auch das zweite Lymphknotenlevel ist in Level IIA und IIB unterteilt. Beide Level erstrecken sich von der Schädelbasis bis zu dem Unterrand des Os hyoideum. Während das Level IIA von dem Nervus accessorius und dem Musculus stylohyoideus begrenzt wird, wird Level IIB neben dem nervus accessorius von dem Musculus sternocleidomastoideus begrenzt. Level III wird kranial von dem Os hyoideum und kaudal von der Cartilago cricoidea begrenzt. Level IV wird von dem Musculus sternocleidomastoideus, dem Musculus trapezius und der Cartilago cricoidea umschlossen. In zwei Subtypen, nämlich Level VA und VB, wird das fünfte Level wieder unterteilt. Beide Subtypen werden von der Cartilago cricoidea, dem Musculus sternocleidomastoideus und dem Musculus trapezius begrenzt. Bei Level VB wird jedoch zusätzlich die Clavicula einbezogen. Level VI umfasst das Os hyoideum und das Sternum, jedoch wird dieses Level nur in den seltensten Fällen ausgeräumt. Die radikale Neck Dissection umfasst die Level I bis V und es werden bei diesem Vorgehen wichtige anatomische Strukturen, wie der Musculus sternocleidomastoideus, die Arteria jugularis interna und die akzessorische Spinalnervene geopfert. Die modifizierte radikale Neck Dissection umfasst ebenfalls die Level I bis V, wobei einige der zuvor erwähnten anatomischen Strukturen erhalten werden können. Bei der selektiven Neck Dissection wird mindestens eines der fünf Lymphknotenlevel nicht ausgeräumt und es kommt zu keiner Opferung der genannten anatomischen Strukturen. Die erweiterte Neck Dissection umfasst mindestens einen Lymphknoten, der nicht in der zuvor vorgestellten Lymphknoteneinteilung erfasst wurde. Zusätzlich kann es zu einer Resektion von weiteren anatomischen Strukturen kommen, wie beispielsweise der Arteria carotis. Die Wahl der durchzuführenden Neck Dissection ist abhängig von unterschiedlichen Faktoren, wie der TNM-Einstufung des Tumors sowie der Lokalisation des Tumors.[27, 28]

Steht keine Heilung mehr in Aussicht, sondern handelt es sich ausschließlich um palliative Maßnahmen, so kann eine Chemotherapie durchgeführt werden. Ist der Allgemeinzustand des Patienten abgesehen von der Krebserkrankung gut, so kann auch eine Kombinationschemotherapie mit 5-Flourouracil und Cisplatin durchgeführt werden. Jedoch müssen hier die Nebenwirkungen in Relation zu dem Nutzen einer Chemotherapie abgewogen werden. Zu bedenken ist auch, dass Patienten mit einem Tumor in dem Kopf- Halsbereich eine besondere palliative Supporttherapie benötigen. So kann es aufgrund der Erkrankung

und bzw. oder der Therapie zu verschiedenen Symptomen kommen, wie beispielsweise Schluckstörungen und Luftnot. Je früher hier eine palliative Versorgung stattfindet, desto mehr kann die Lebensqualität verbessert werden [23]. So vielfältig die Behandlungsmethoden auch sind, so variabel sind auch die Nebenwirkungen. Bei der Strahlentherapie wird unterschieden in akute und chronische Folgen sowie die Spätfolgen. Zudem äußern sich die Auswirkungen der Therapie auch auf jedes Organ anders. So kann es in der Mundhöhle zu einer Xerostomie und der Beeinträchtigung des Geschmacksinns kommen. Auch das Ohr kann Folgen der Strahlentherapie davon tragen, dazu gehören die akute Otitis externa und media sowie eine Hörminderung um bis zu 15dB [18].

Auch bei der Chemotherapie kann es zu Nebenwirkungen kommen, wobei diese abhängig von dem eingesetzten Zytostatikum sind. Zu den bekanntesten Folgen einer Chemotherapie gehören Haarausfall, Erbrechen und Übelkeit. In Bezug auf 5-Flourouracil können Photosensibilisierung und eine hepatische Nekrose auftreten. Außerdem muss bei der Gabe von Cis-Platin die nierentoxische Wirkung bedacht werden. Um diese voraussagbaren Nebenwirkungen einer Polychemotherapieschemas zu reduzieren, können Blutzelltransplantationen eingesetzt werden. Derzeit wird zudem die Verringerung der Nephrotoxizität durch die Gabe von Thiosulfaten erforscht [24].

Die Prognose ist abhängig von der Lokalisation des Tumors und dem Zeitpunkt der Diagnose. Je früher die Diagnose gestellt wurde, desto besser sind die Aussichten auf eine Heilung. Unter adäquater Therapie haben somit Tumore des ersten Stadiums eine sehr gute Heilungschance, dies gilt auch für Tumore der Lippen und Speicheldrüsen. Eine deutlich schlechtere Prognose ist bei Pharynxkarzinomen zu erwarten [29].

### 2.2.1 Entstehung der Kopf-, Halstumore auf genetischer Ebene

Dem Entstehen eines Karzinoms im Kopf-, Halsbereich gehen die vier Stadien Initiation, Promotion, Progression und Invasion voraus. Zunächst kommt es zu einem Verlust von 9p21, wodurch der Cyclin-D1/CDK4-Komplex nicht mehr inhibiert werden kann. Anschließend folgt der Verlust des 3p- und des 17p-Gens, was dazu führt, dass aus einer benignen plattenepithelialen Hyperplasie eine Dysplasie entsteht. Durch den Verlust von 11q, 13q und 14q kommt es auch zu einer Mutation von p53 [30]. Eine solche Mutation findet sich in 60-80% aller HNSCC Fälle.

P53 reguliert indirekt die Apoptose über die Bcl-2-Familie, bei welchen es sich um Proteine mit pro- bzw. antiapoptotischen Eigenschaften handelt. Eine Mutation in dem p53-Gen kann diese

Funktion nun stark einschränken und somit das Tumorzellwachstum und die Resistenz gegenüber einer Chemotherapie fördern [25].

Dieses Tumorsuppressorgen ist insbesondere relevant für die Entstehung von HPV-positiven Tumoren. Bereits in einem frühen Stadium der Krebserkrankung kommt es zu einem Abbau von p53 durch das Onkoprotein HPV E16. P53 wird als Reaktion auf DNA-Schäden durch die Kinasen CHK 1 und CHK 2 aktiviert und führt zu einer Unterbrechung des Zellzyklus und somit auch zur Apoptose. Zu der gleichen Familie zählt auch TP63, zu welchem die beiden Isoformen Tap63 und  $\Delta Np63$  gehören. Letztere reguliert Wachstumsfaktorsignalisierungen, die Seneszenz, sowie das Überleben der Zellen. Nach dem neusten Wissenstand beeinflusst  $\Delta Np63$  auch das Transkriptionsprogramm von HNSCC, welches proliferativ und überlebensfördernd wirkt. [31].

Wichtige zelluläre Prozesse in Karzinomen sind die Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), des Cyclin-1 und der Cyclooxygenase-2. Hinzu kommt die Aktivierung der Telomerase [25].

Der Zellzyklus wird zwischen den Abschnitten G0 und G1 von dem Retinoblastom-Tumorsuppressor (RB) reguliert. Dieser Tumorsuppressor kann von unterschiedlichen Mechanismen reguliert werden, zu welchen der Verlust der Heterozygotie, die Deletion und die Mutation zählen. Das zuvor angesprochene HPV kann das RB inaktivieren. In Kombination mit p53 können sich die Krebszellen unbegrenzt replizieren [31], [25].

Auch der Signalweg des EGFR beeinflusst die Entstehung von HNSCC, da Studien nahelegen, dass in vielen dieser Tumore eine Überexprimierung von EGFR gefunden werden kann. Diese kann sowohl durch Genamplifikation als auch durch Phosphorylierung des Rezeptors entstehen. Die häufigste Veränderung dieses Rezeptors findet sich in EGFRvIII, welches zu einer Aktivierung des Rezeptors und zu einer Resistenz gegenüber Zytostatika führt.

Ein weiterer wichtiger Signalweg ist der des NOTCH 1, ein transmembraner Rezeptor, welcher für 10-19% aller HNSCC verantwortlich ist. In gesundem Gewebe fungiert NOTCH 1 als Tumorsuppressorgen, allerdings kommt es bei einer Mutation zu einer Silenzierung des erwähnten Signalwegs [25].

Der Akt-Signalweg beeinflusst auch die Eigenschaften des HNSCC. Ist dieser Signalweg aktiviert, so handelt es sich um einen aggressiven und invadierenden Tumor. Jener Signalweg kann nicht mehr abgestellt werden und die Zellen proliferieren unkontrollierbar. Bei Akt handelt es sich um eine Serin-/ Threonin-Kinase, welche unterschiedliche Proteine reguliert. Zu diesen zählen Apoptose- und Zellzyklusinhibitoren [25], [32].

## 2.3 Nukleäre Rezeptoren

In allen mehrzelligen Lebewesen, ausgeschlossen sind Pflanzen und Pilze, finden sich nukleäre Rezeptoren [33, 34]. Allein im menschlichen Körper sind 48 verschiedene nukleäre Rezeptoren vorhanden [35]. Vereinfacht werden diese auch Kernrezeptoren genannt und zeichnen sich im Vergleich zu Membranrezeptoren durch ihre Lokalisation aus. So befinden sie sich nicht auf der Membran einer Zelle, sondern in dem Nukleus. Dies ist relevant für hydrophobe Signalmoleküle, wie beispielsweise Steroidhormone und Vitamine. Binden Signalmoleküle an nukleäre Rezeptoren, so kommt es zu einer Veränderung der Transkriptionsaktivität des Rezeptors. Durch eben diese Aktivierung regulieren die nukleären Rezeptoren die primäre und sekundäre Zielgenexpression, was wiederum unter anderem die Apoptose und Proliferation beeinflussen kann.

Auf molekularer Ebene betrachtet bestehen die Kernrezeptoren aus einem C-terminalen und einem N-terminalen Ende. Letzteres beinhaltet eine autonome Transkriptionsaktivierungsfunktion, welche durch die Bindung an eine DNA-Domäne die Transkription beeinflusst. Diese Funktion kann bei bestimmten Steroidhormonen jedoch nur stattfinden, wenn ein Agonist bzw. Antagonist vorhanden ist. Die Wirkungsweise des N-terminalen Endes wird zudem durch alternatives Spleißen und dem unterschiedlichen Nutzen des vorliegenden Promotors beeinflusst.

Im Gegensatz dazu befindet sich in dem C-terminalen Ende die DNA-Bindungsdomäne, die eine spezifische DNA-Erkennung erlaubt. Jene besitzt eine  $\alpha$ -helicale, globuläre Struktur und ist neben der Ligandenbindung für die Dimerisierung zuständig [33]. Die DNA-Bindungsdomäne kann drei verschiedene Bindungsformen einnehmen. Zu diesen gehören die Ausbildung eines Homodimers, eines anisotropen heterodimeren Komplexes und eines Monomers [34].

Bei der E-Region handelt es sich um die Ligandenbindungsstelle des Rezeptors, welche unterschiedliche, ligandenabhängige Funktionen beinhaltet. Diese Region enthält auch die zweite Aktivierungsdomäne [34], [35].

Zwischen dem C-terminalen Ende und der E-Region befindet sich die D-Region. Jene ist derzeit weniger genau untersucht, jedoch gibt es hierbei die Hypothese, dass diese es den Bindungsdomänen ermöglicht verschiedene Konformationen einzunehmen. Zudem enthält sie die Hauptkernlokalisierungssequenz [35], [34].

Einige Kernrezeptoren verfügen zusätzlich über eine F-Region, deren Funktion noch nicht eindeutig geklärt ist. So zeigen einige Studien auf, dass diese Region die Spezifität der Ligandenbindungsstelle und die Coaktivator-Rekrutierung beeinflusst [34].

### 2.3.1 Nukleäre Rezeptoren in Krebs

In Bezug auf Krebs werden nukleäre Rezeptoren genutzt, um mittels der Signalübertragung Tumorsuppressoren zu unterdrücken und Onkogene zu aktivieren. Somit können sie eindeutig die zuvor erwähnten „hallmarks of cancer“ vorweisen. So variabel die Familie der Kernrezeptoren auch ist, so unterschiedlich sind auch ihre Einflüsse bei der Entstehung von Tumoren. So spielt beispielweise ER eine wichtige Rolle bei Brustkrebs. Kommt es aufgrund einer erhöhten Hormonsekretion zu einer vermehrten Stimulation des Signalwegs, so kann sich die Krebsinzidenz für ein Mammakarzinom erhöhen. Auch AR ist ein hormonabhängiger Rezeptor, der vermutlich für die Entstehung von Prostatakrebs relevant ist. Neben dem Testosteronspiegel wird der Rezeptor auch durch die Aktivität von Coregulatoren beeinflusst. Werden diese fehlreguliert, so kann auch die Aktivität von AR beeinflusst werden.

Nukleäre Rezeptoren werden ebenso in Kopf-, und Halstumoren exprimiert, wobei sich die meisten Studien bisher auf die Thyroid-Hormon-Rezeptoren und Östrogenrezeptor-ähnlichen Rezeptoren konzentriert haben. Eine Untergruppe der Thyroid-Hormon-Rezeptoren sind die Retinoid-Säure-Rezeptoren (RAR). Die Aktivierung jenes Rezeptors führt zu Differenzierung und Apoptose und kann somit das Tumorwachstum verhindern. Eine reduzierte Konzentration dieses Rezeptors ist bei HNC und in präkanzerösen Läsionen in der Mundschleimhaut auffindbar. Eine verringerte Expression des Rezeptors ist ebenso verbunden mit einer geringeren Überlebenserwartung. Der genaue molekulargenetische Vorgang ist zwar unerforscht, jedoch existieren erste Hypothesen, welche eine verringerte Konzentration des Retinoid-Säure-Rezeptors mit einer Hypermethylierung des CpG Anteils auf der Promotorregion des RAR erklären. Zudem soll eine verminderte RAR Konzentration mit einem Mangel an Vitamin A zusammenhängen. Erste Studien haben gezeigt, dass die Gabe von Retinoiden die Entstehung von HNC verhindern kann [36, 37].

Eine weitere Untergruppe der Thyroid-Hormon-Rezeptoren sind Peroxisom-Proliferator-aktivierende-Rezeptoren (PPAR), welche die Transkription regulieren und die Entstehung von Entzündungen begrenzen. Zwar ist die genaue Rolle, die PPAR bei HNC einnimmt, ungeklärt, allerdings findet sich in HNSCC eine Überexpression des Rezeptors. Bindet ein Ligand an PPAR, so wird die Differenzierung inhibiert und die Apoptose der Tumorzellen eingeleitet. Eine Gabe synthetisch hergestellter PPAR-Liganden könnte sich somit als Krebsmedikament in der Zukunft anbieten [37].

Die Expression des Östrogenrezeptor-ähnlichen Rezeptors findet sich in unterschiedlichen Subklassen des HNC, wie beispielsweise Speicheldrüsentumore und pleomorphen Adenomen. Jedoch variieren die Ergebnisse unterschiedlicher Studien bezüglich eines Zusammenhangs zwischen HNC und der Expression des Östrogenrezeptors [37]. Aktuellen Erkenntnissen nach zu urteilen besteht eine Korrelation zwischen dem Östrogenrezeptor ER $\alpha$

und HPV-positiven oropharyngealen Tumoren. Vermutlich fördert Erα die Integration des HPV-Gens in das Wirtsgenom [38].

### 2.3.2 Der Vitamin D Rezeptor

VDR kann in den meisten Zellen gefunden werden und besitzt über 1000 Zielgene. Er beteiligt sich nicht nur am Kalzium- und Vitamin D- Stoffwechsel, sondern aktuelle Erkenntnisse deuten auch an, dass er sowohl als Entzündungsmediator dienen kann, als auch in Östrogen-Signalwegen von Bedeutung ist. Nach den neusten Studien ist die Überexpression von VDR zudem relevant für die Tumorentstehung. VDR kann zum einen genetisch, zum anderen durch verschiedene Umweltfaktoren, wie Alter, Infektionen und Sonneneinstrahlung beeinflusst werden. Auch Hormone, wie das Parathormon, die Retinsäure und Glukokortikoide können den Rezeptor regulieren [39].

Dieser Rezeptor kann in zwei Gruppen unterteilt werden, der nukleare und der Membran-Vitamin D Rezeptor. Ersterer ist für die genetischen Einflüsse, wie beispielsweise Genexpression, zuständig, während der zweite Rezeptor nicht-genetische Wirkungen ausübt [39], [2].

Der nukleare Vitamin D Rezeptor (nVDR) gehört der Familie der nukleären Rezeptoren an und reguliert die Transkription durch die Exprimierung von Genen. Über 100kb kodieren für das Gen des nVDR, welches Exons innehat. Das zweite und das dritte Exon kodieren die Translationsseite, welche 66 Aminosäuren besitzt, und binden somit DNA. Hier findet sich das Merkmal der Familie der nukleären Rezeptoren in Form zweier Zink-Finger-Domänen wieder. Die Liganden-bindende und die Heterodimerisations-Domäne, welche aus 300 Aminosäuren bestehen, werden durch die Exons 4 bis 9 kodiert. Bindet ein Ligand an diese Domäne, so kommt es zu einer Konformationsänderung an Helix-12, was zu unterschiedlichen Wechselwirkungen mit Kernproteinen führt [40], [2].

Bindet Vitamin D nun an den Rezeptor, so bilden sich zwei Proteininteraktionsflächen, welche für Bindung von DNA und die Rekrutierung von koregulatorischen Komplexen von Nöten sind. Der VDR bindet nun an die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR), wodurch ein Hetero-dimer entsteht, welches durch die zu vorige Bindung mit dem Vitamin D noch stärker heterodimerisiert wird. Zudem kommt es nach der Bindung des Vitamins zu einer Phosphorylierung des VDR und einer Rekonfiguration der AF-2-Domäne, um so die Helix-12-Domäne über die Ligandenbindungstasche zu legen. Das Vitamin-D-Reaktionselement (VDRE), das von zwei hexameren Kernbindungsmotiven gebildet wird und sich in der Promotorregion von VDR-responsiven Genen befindet, wird von diesem Heterodimer erkannt und es kommt Aktivierung

bzw. Inhibition der Transkription. Dies ist wiederum abhängig von den Coaktivatoren, bei denen sich um Corepressoren oder Coaktivatoren handeln kann. Abhängig von dem Phosphorylierungsstatus und der Veränderung in der Konformation des Heterodimers, dissoziiert der Corepressor-Komplex und ein Koaktivator-Komplex kann gebunden werden. Anschließend folgt die Autoacetylierung von SRC-1 und CBP/p300, die hierdurch zusammen mit PBAF von dem Heterodimer dissoziieren. Der DRIP205 Mediator bindet nun an die AF-2 des VDR, was dazu führt, dass weitere Mediatoren angezogen werden. Nun wird der Transkriptionsfaktor II B an die RNA-Polymerase 2 übergeben. Dieser Komplex löst sich von dem Promotor, nachdem der DRIP205/Mediator und NCoA-62, der nukleare Corezeptor 62, dissoziiert sind und durch TRIP1, welches VDR ubiquitiert, ersetzt wurden. Der Ubiquitin-Ligationsprozess kann nun drei unterschiedliche Wege einschlagen. Zum einen kann TRIP1 dissoziieren und somit können verschiedene Coaktivatoren binden. Dies führt zu einer schnellen Wiederaufnahme der Transkription. Eine Alternative hierzu wäre die Dissoziation des Liganden Vitamin D, wodurch ein nicht ligandengebundener VDR-RXR-Komplex entsteht. Die letzte Möglichkeit wäre die Übertragung des VDR an das 26S-Proteasom. Dieser Vorgang tritt nach einigen Durchgängen der Ubiquitierung ein und beschreibt den Abbau des Rezeptors.

Ist der Ligand RXR jedoch nicht an VDR gebunden, so kann VDR mit CoR-Proteinen interagieren, die, wenn sich die AF-2 in einer inaktiven Konfiguration befindet, eine hohe Affinität zu Histon-Deacetylasen besitzen. Sie reduzieren die Acetylierung der Nukleosomen und es kommt damit zu einer positiven Ladung sowie einer stärkeren Anziehung gegenüber der DNA. Zu diesen Coregulatoren gehört auch PBAF, welches Chromatin umgestaltet, um das VDR-RXR-Heterodimer zu einem Gen zu locken [2], [40], [41], [42].

Die über 1000 Zielgene des nVDR reagieren auf unterschiedliche Weise.

Membran-VDR findet sich auf Plasma- und Vesikelmembranen und ist für die nicht genetischen Einflüsse zuständig. Der mVDR steht in Verbindung mit Proteinen, wie Caveolin, das bei der Bildung von Caveolae beteiligt ist. So sind sie direkt mit dem Signalweg verbunden und führen nach der Bindung eines Liganden zu einer schnellen Antwort des Rezeptors und somit zu einer Reaktion [2].

### 2.3.3 Der Vitamin D Rezeptor in Bezug auf Krebs

Bei vielen Krebsarten ist der Vitamin D Rezeptor überexprimiert und grundsätzlich gilt je höher das Level an VDR, desto invasiver die Krebserkrankung. Ein Beispiel hierfür ist der nichtmelanozytärer Hautkrebs, da neben  $\Delta Np63$  auch das Level an VDR stark erhöht ist. Es

wurde gezeigt, dass VDR unabhängig von Vitamin D Differenzierung aktivieren kann. Jedoch wird die Expression von VDR positiv von  $\Delta Np63\alpha$  beeinflusst. Wird  $\Delta Np63\alpha$  nun reduziert, so kann das therapeutische Ziel von Vitamin D verbessert werden. Zu Grunde liegt hier, dass  $\Delta Np63\alpha$  die Resistenz gegen Cisplatin bei Kopf- und Hals-, sowie Brusttumoren vermittelt [43].

Auch bei Darmkrebs übernimmt VDR eine wichtige Rolle. So ist VDR stark bei Resistenzen gegen Chemotherapie, BRAF (ein Mitglied der Raf-Kinase-Familie) – Inhibitoren und PI3K-mTOR-Inhibitoren überexprimiert. Dies tritt vor allem zu Beginn der Erkrankung auf, während bei einer fortgeschrittenen Metastasierung der Level an VDR sinkt. VDR wird über die Ausschüttung des Vitamin D reguliert und beeinflusst die Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Krebszellen [44], [45], [46].

Wie zuvor erwähnt kann VDR auch in Brustkrebs nachgewiesen werden. So ist die VDR-Expression in duktuale Karzinomen ähnlich zu der in invasiven Tumoren. Es gibt vier verschiedenen Polymorphismen von VDR, welche zu Krebs führen können. Verschiedene Studien haben aufgezeigt, dass diese Polymorphismen zwar für die weiße Population unerheblich sind, allerdings können sie bei Menschen mit einer dunkleren Hautfarbe Brustkrebs hervorrufen. Eines dieser Polymorphismen ist Fok1, welches sich in dem kodierenden Bereich des VDR-Gens befindet und sorgt für die Verlängerung des Rezeptors um drei Aminosäuren. Verschiedene Studien legen nahe, dass ein Zusammenhang zwischen diesem Restriktionslängenpolymorphismus und Brustkrebs vorliegt. Das Bsm1 B Allel hat zwar keinen Einfluss auf Brustkrebs, allerdings reduziert es das Risiko an Darm- und Hautkrebs zu erkranken [47], [45], [48].

Allerdings gibt es auch Krebsarten, bei denen ein hohes Level an VDR ein Vorteil sein kann. So sorgt eine große Expression von VDR für ein geringeres Risiko an letalem Prostatakrebs zu erkranken. Die Überexpression von nVDR ist assoziiert mit einer besseren Überlebensrate von Lungenkrebspatienten [49].

Laut der Studie von Podgorska, E. et al. beeinflusst VDR die Tumormunität und die Progression von Melanomzellen [50]. Hierzu wurden zwei Zelllinien verglichen, eine unveränderte Melanomzelllinie mit einer regulären Expression an VDR, und eine Zelllinie, bei welcher das VDR-Gen ausgeschaltet wurde. Es kam bei der veränderten Zelllinie zu einem beschleunigten Wachstum und zu einer veränderten Zellmorphologie. Hier zeigt sich somit, dass eine geringe Expression von VDR bei Melanomzellen mit einer erhöhten Tumormunität, einer verringerten Proliferation und somit einer größeren Malignität einhergeht. Demnach kann VDR in Melanomzellen als Tumorsuppressorgen fungieren [51]. Zudem besagt die Studie von Brozyna, A. A. et al., dass VDR auch die Überlebensrate bei Melanomen beeinflusst [52]. Ist die Expression von VDR hoch und findet sich keine Ulzeration,

so deutet dies auf die beste Überlebensrate hin. Polymorphismen in einzelnen Nukleotiden des VDR können die Pathogenese, die Entwicklung und das Überleben der Melanomzellen beeinflussen.

#### 2.3.4 Der Vitamin D Rezeptor in HNSCC

Sowohl endogene als auch exogene Reize führen zu unterschiedlichen molekularen Veränderungen, welche schlussendlich zu Krebs führen können. Insbesondere soll hier auf das potenzielle Kanzerogen VDR in Bezug auf Kopf- und Halstumore eingegangen werden.

Grimm et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen VDR und Mundhöhlenkrebs [39]. Sie kamen zu dem Entschluss, dass eine Reduktion an VDR zu einem Rückgang des Tumors führt. Zwar stellten sie darüber hinaus die Hypothese auf, dass Krebszellen, welche von CD44+-Krebsstammzellen abstammen, besser auf eine Behandlung ansprechen, allerdings konnte hier kein Zusammenhang zu VDR gefunden werden. Unklar ist zudem, inwiefern Polymorphismen im VDR-Gen das Risiko an Mundhöhlenkrebs zu erkranken beeinflussen. Die Verteilung des VDR-Taq-I-Genotyps demonstriert, dass Patienten, die einen großen Anteil an diesem Genotyp besitzen, ein höheres Risiko haben an OSCC zu erkranken. Die größte Hürde im Kampf gegen die Erkrankung stellt die Chemotherapie dar, da es häufig im Rahmen von OSCC zu Resistenzen gegenüber der Behandlung kommt. Hier gilt ein niedriger VDR-Spiegel als prognostisch ungünstig in Bezug auf das Überleben des Patienten. Relevant für den VDR-Spiegel ist auch der Zeitpunkt der Erkrankung. Liegt eine frühere, präkanzeröse Erkrankung vor, so ist die Expression an VDR höher als wenn es sich beispielsweise um ein invasives Karzinom handelt [32].

Patienten, die an HNSCC erkrankt sind und FokI T/T Genotyp aufweisen, haben eine geringere Überlebenschance. Ein weiterer Polymorphismus, der diese Art von Krebs positiv beeinflusst, betrifft das Allel Taq1. Je höher die Anzahl der t- bzw. f-Allelen bei diesem Polymorphismus, desto geringer ist das Risiko an HNSCC zu erkranken, somit können diese beiden Allele als Schutz dienen. Dennoch ist der genaue Mechanismus ungeklärt und muss in Zukunft erforscht werden.

Hier gilt auch, dass bei HNSCC mehr VDR exprimiert wird als bei gesunden der gesunden Bevölkerung. Zudem korreliert die Expression des VDR mit der Differenzierung des Tumors, somit kann VDR als Marker für Tumore mit Metastasierungstendenz angesehen werden. Das Hochregulieren von VDR könnte unter anderem abhängig von einer HPV-Erkrankung sein. Ist der Patient HPV-negativ, so ist die VDR-Expression höher als bei HPV-positiven Patienten, allerdings handelt es sich hierbei lediglich um eine Hypothese. Die Überexpression von VDR

verstärkt auch die Resistenz gegenüber dem Zytostatikum Cisplatin. Die Gabe von Vitamin D hingegen unterstützt die Wirkung von Cisplatin, indem es die Expression von VDR fördert. Dies führt wiederum zu einer erhöhten Ausschüttung von BIM, einem proapoptotischen Protein. Es kommt zu einer erhöhten Rate an Zelltoden und DNA-Schäden sowie einem verringerten Migrationspotenzial. Das Metastasierungspotenzial wird verringert, indem Vitamin D der epithelialen mesenchymalen Transition entgegenwirkt. Der größte Effekt auf BIM wird hierbei durch die gleichzeitige Gabe von Vitamin D und Cisplatin hervorgerufen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass BIM ein verbessertes krankheitsspezifisches Überleben mit sich bringt. Diese These wird dadurch unterstützt, dass krebsfreie Patienten einen hohen BIM-Spiegel aufweisen [32], [48], [53], [5].

## 2.4 Der Ligand Vitamin D

Vitamin D gehört zu den Steroiden und ist in den Formen Ergocalciferol, welches von Pflanzen gebildet wird, und Cholecalciferol, welches der Mensch selbst aus 7-Dehydrocholesterol durch den Einfluss von UV-Strahlen synthetisieren kann, für den menschlichen Körper von Bedeutung. Jedoch ist letzteres wirksamer und somit bedeutender für die menschliche Physiologie. Der tägliche Bedarf an Vitamin D liegt bei 20µg, was wiederum 1000 internationale Einheiten (IE) entspricht, und kann sowohl durch Sonnenstrahlung als auch durch Lebensmittel gedeckt werden. Hierzu zählen Meerestiere, Pilze, Fleisch und Milchprodukte, wobei das Level an VitD bei Letzteren eher gering ist. Während durch die Haut synthetisiertes VitD in das Blut, wodurch der Vit.D Spiegel im Blutserum gemessen werden kann, abgegeben wird, wird oral zugeführtes VitD von Lipoproteinen und Chylomikronen transportiert [54].

Das aufgenommene VitD ist zunächst inaktiv und benötigt zwei Hydroxylierungsschritte. In der Leber wird das inaktive VitD mittels des Enzyms CYP2R1- Hydroxylase in 25(OH)D umgewandelt. Anschließend wird jenes durch die CYP27B1-Hydroxylase in der Niere zu 1,25(OH)2D3 umwandelt, wobei dieser Schritt streng durch das Parathormon, welches die Aktivität der CYP27B1-Hydroxylase erhöht, und den Fibroblast-Wachstumsfaktor 23 reguliert, um so den Calcium- und Phosphatspiegel in einem physiologischen Niveau zu halten. Zudem reguliert Calcitriol den Metabolismus des Vitamins, und somit auch den Spiegel an Calcium und Phosphat, über einen negativen Rückkopplungsmechanismus. CYP24A1, ein VitD inaktivierendes Enzym, ist ein Transkriptionsziel des Calcitriol-VDR-RXR-Komplexes. Hat das Level an Calcitriol eine bestimmte Marke überschritten, so bindet dieser Komplex und die negative Rückkopplung kann starten. Dieses Enzym wird in Tumorgewebe verstärkt exprimiert, was in einen VitD Mangel resultiert. Zudem ist die Hochregulierung dieses Enzyms mit einem verringerten Gesamtüberleben, einer Lymphnotenmetastasierung und einer Invasion in umliegendes Gewebe verbunden. Seit Kurzem wird über einen alternativen Signalweg diskutiert. CYP11A1, ein Enzym, welches bei der Steroidogenese von Bedeutung ist, soll VitD an dem 20. oder 22. Kohlenstoffatom hydroxylieren, ohne dabei eine Seitenkette abzuspalten. Schätzungsweise entstehen durch weitere Hydroxylierungsschritte allein durch diesen neuen Signalweg 21 verschiedene VitD-Metabolite, welche antiproliferative, differenzierende und entzündungshemmende Effekte in der Haut hervorrufen. Für 1,25(OH)2D3 existieren unterschiedliche Synonyme, dazu zählen 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 und Calcitriol. [55], (25), [56], [49], [57].

Vitamin D kann auf unterschiedliche Art und Weise wirken. Seine endokrine Funktion umfasst das Aufrechterhalten des Calcium- und Phosphatspiegels, indem die Calcium- und Phosphatabsorption erhöht wird. Darüber hinaus kann es in der Schwangerschaft bei der

Bildung der Plazenta und der Immuntoleranz mitwirken, die Insulinsekretion fördern und nicht zuletzt die Apoptoserate in Tumorzellen steigern. Zudem schützt und reguliert es den zerebralen Wachstumsfaktor. [54], [58]

Die Ursachen für den Mangel an VitD sind vielfältig und beinhalten eine geringe Sonnenexposition, eine geringe Aufnahme von kalziumreicher Nahrung und eine eingeschränkte Absorption des Vitamins im Magen. Dieser Mangel kann zu unterschiedlichen Krankheiten führen, hierzu zählen den Stützapparat betreffend die Rachitis, die Osteoporose und die Osteomalazie. Durch die Verringerung der Aktivität des Immunsystems kann es zu Infektionen kommen [54] [55].

#### 2.4.1 Vitamin D und Krebs

Im Allgemeinen wird angenommen, dass ein geringer VitD- Spiegel nicht nur in Zusammenhang mit einer erhöhten Gesamtmortalität und Entzündungszeichen steht, sondern auch mit Krebserkrankungen [59], [60]. Eine Defizienz des Steroids wird unter anderem mit Prostata-, Mamma- und Kolonkarzinomen in Verbindung gebracht. Es besteht somit eine inverse Korrelation zwischen der Expression des Steroids und der Entstehung der zuvor genannten Krebsarten. Eine direkte Korrelation wurde zwischen dem Pankreaskarzinom und einer Suffizienz an Vitamin D beschrieben [61]. Hierbei wirkt VitD durch Aufrechterhaltung oder Störung der physiologischen Hämostase fördernd bzw. hemmend [62].

Studien belegen, dass hohe Dosen an Calcitriol die Proliferationsrate von Krebszellen senken können [63]. Diese Erkenntnis wurde von klinischen Forschern als Ansatzpunkt verwendet, um die Wirkung von Vitamin D als Prävention bzw. Tumorbehandlung zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Forschungen waren jedoch uneinheitlich, was wiederum dazu führte, dass keine allgemeinen Empfehlungen für eine VitD-Supplementierung gegeben werden konnten [64]. Es zeigte sich jedoch eine positive Korrelation zwischen der Zufuhr von VitD und einer verbesserten Prognose bzw. einem geringeren Risiko an Krebs zu erkranken [65].

Die Gabe von VitD kann die Mortalität in Zusammenhang mit Tumoren senken, wenn es täglich supplementiert wird. Die Studie von P. D. Chandler et al. unterstützt diese These [66]. Hier wurden gesunde Probanden in zwei Gruppen eingeteilt, eine erhielt eine Supplementierung von VitD in Form von 2000 IE pro Tag, während der Kontrollgruppe kein VitD verabreicht wurde. Nach 5 Jahren zeigten die Probanden, denen VitD verabreicht wurde, eine geringere Anzahl an Krebserkrankungen auf, insbesondere Patienten mit einem Normalgewicht profitierten von der Behandlung. Dem steht jedoch die Hypothese entgegen, dass eine

optimale Dosis 400 IE pro Tag beträgt, da eine höhere Dosis als 2000 IE im Verdacht steht wiederum Krebserkrankungen hervorzurufen [57].

Bezüglich HNSCC ist die Supplementierung von VitD umstritten. Einige Studien empfehlen die Gabe von hohen Dosen an VitD in Intervallen, andere empfehlen eine Kombinationstherapie [67, 68]. Eine mögliche Kombinationstherapie wurde unter anderem auch in der Studie von Khamis et al. untersucht [69]. Eine Behandlung der HNSCC Zellen mit Cisplatin und VitD führte hier zu einer vergrößerten Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber dem Zytostatikum und somit zu einer verringerten Mobilität der Zellen. Dem liegt eine Resistenz der HNSCC Zellen zugrunde, welche durch die zusätzliche Supplementierung von VitD überwunden werden kann. Dies geschieht durch eine Hochregulierung von VDR.

Die Studie von Bochen et. al fand im Vergleich zu den Kontrollgruppen ein geringes Blutserum-Level an VitD in Patienten, die an HNSCC erkrankt waren [70]. Ein geringes Serumlevel an VitD korrelierte hier sowohl mit Lymphmetastasen als auch mit einem negativen HPV-Status und führte zu einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit. Zudem zeigten Patienten mit einem hohen Defizit an VitD signifikant veränderte peri- und intratumorale Immunezellinfiltratsspiegel.

#### 2.4.3 Molekulare Wirkmechanismen von Vitamin D

Zu Beginn einer Krebserkrankung kommt es zu genetischen Mutationen normaler Zellen hinzu Tumorzellen. VitD hat einen antiinflammatorischen Effekt und kann demnach in dem Promotor- und dem Initiationsstadium wirken, was über vier unterschiedliche Mechanismen stattfindet. Der Prostaglandin-Signalweg, welcher von Bedeutung bei Prostata- und Brustkrebs ist, wird durch die Hemmung der Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) gestoppt. VitD hemmt auch den p38 MAPK Signalweg, indem die MAPK-Phosphatase-5 vermehrt exprimiert wird und somit die Produktion von Zytokinen gehemmt wird. Auch dieser Signalweg nimmt eine tragende Rolle in Prostatakarzinomen ein. Bei dem dritten Mechanismus hemmt Calcitriol den NFkB (Nuklearfaktor kappa B) – Signalweg, welcher durch die Aktivierung von antiapoptotischen Genen zu einer Resistenz gegenüber Zytostatika führen kann. Die Thioesterase Superfamily Member 4 wird hochreguliert, was dazu führt, dass die Expression von NFkB und COX-2 gehemmt wird. Zuletzt unterstützt VitD die Kommunikation zwischen Krebs- und Immunezellen und unterdrückt somit die Produktion von Zytokinen. Darüber hinaus beeinflusst VitD auch die Apoptose, indem proapoptotische Proteine hoch und antiapoptotische Proteine herunterreguliert werden. Hinzu kommt der antiproliferative Effekt, welcher durch die Stimulation der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 sowie durch E-Cadherin, das als Gen die Metastasierung von Tumoren beeinflusst, hervorgerufen wird. [49], [45], [71]

In Bezug auf HNSCC wird durch die Supplementierung von VitD die Zellzyklusinhibitoren p18, p21 und p27 verstärkt exprimiert. Bei HNSCC kommt es generell zu einer verstärkten Aktivierung der Telomerase, was wiederum durch VitD gehemmt werden kann. Auch genetische Varianten von den Enzymen CYP2R1 und CYP24A1, sowie das Vitamin D-Bindungsprotein korrelieren mit dem Auftreten von HNSCC, indem sie mit dem Spiegel an VitD korrelieren. Hier zeigt sich, dass genetische Variation an eben diesen Stellen als prognostische Marker für eine potenzielle HNSCC-Erkrankung dienen können. Immunsuppressive, unreife dendritische Zellen lagern sich vermehrt in Tumorgewebe an. Bei der Behandlung mit VitD vor einer Resektion des HNSCC wird die Anzahl eben dieser dendritischen Zellen reduziert. Nicht nur an dieser Stelle beeinflusst ein erhöhter VitD-Spiegel die Immunreaktion, sondern er fördert auch die Migration von CD4+-Zellen, einer Gruppe Lymphozyten, die die Immunabwehr koordinieren, in das Tumorstroma und erhöht somit das Gesamtüberleben. VitD soll auch die Anzahl an CD8+T-, natürlichen Killerzellen und Makrophagen in HNSCC erhöhen. Ein niedriger VitD-Spiegel fördert dahingegen das Vorhandensein von immunsuppressiven Makrophagen M2 in Tumorgewebe, die wiederum mit einer verringerten Gesamtüberlebensrate assoziiert sind. Die Behandlung jener Krebserkrankung geht häufig mit einer Mangelernährung einher, was zu Muskelschwund und einer Mukositis führt. Diese Symptome sind auch Patienten mit einem VitD-Mangel bekannt und verschärfen sich somit bei Patienten, die an einer Kombination aus HNSCC und VitD-Mangel leiden. In einer kombinierten Therapie spaltet Calcitriol die Caspase-3 und fördert zugleich die Expression der Mitogen-aktivierten Protein Kinase-Kinase-Kinase. Tumorzellen, welche eine Resistenz gegen Cisplatin aufweisen, können mit VitD vorbehandelt werden. Hierbei werden die Plattenepithelkarzinomzellen gegen Cisplatin sensibilisiert, wodurch es zu einer Wachstumshemmung und zu vermehrter Apoptose kommt. Dieser Vorgang beruht auf einer verstärkten Spaltung durch die Pro-Caspase 10 und einer erhöhten DNA-Fragmentierung.

Demnach wäre hier eine Supplementierung von VitD angebracht.[32], [72], [73]

Jedoch muss zwischen den Patienten mit einer HPV- Infektion und ohne eben einer solchen Erkrankung differenziert werden. Während auf HPV-Patienten die Wirksamkeit einer Supplementierung von VitD zutrifft, so muss dies erst für HPV-negativen Patienten erforscht werden [1].

## 2.5 Thesen

Nach Sichtung der hier repräsentierten Literatur sowie zahlreichen Vorarbeiten wurden folgende Thesen aufgestellt, deren Überprüfung das Ziel der vorliegenden Arbeit ist:

1. Die Expression von VDR korreliert mit dem klinischen Verlauf von HNSCC Patienten. Als Indikatoren gelten hier die Disease Free und die Overall Survival.
2. Das Vorkommen von VDR korreliert mit klinischen Parametern, beispielsweise dem HPV-Status und dem TNM-Stadium.
3. VDR beeinflusst die Proliferation von Zellen. Dies wird anhand einer Korrelation zwischen VDR und Ki67 untersucht.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Generierung eines Patientenkollektivs**

Ausgeschlossen wurden Patienten, deren Krankengeschichten nicht vollständig vorlagen. Zu den erforderlichen Daten, welche für die Krankheitsgeschichte relevant waren, gehörten das Geschlecht, die Lokalisation, das Geburts- sowie gegebenenfalls das Todesdatum, das Datum der Erstdiagnose und des letzten Kontakts. Des Weiteren war das Datum eines diagnostizierten Rezidivs und demnach die generelle Unterteilung in Vorhandensein und nicht Vorhandensein eines Rezidivs von Bedeutung. Das Rauchverhalten wurde in „pack years“ erfasst mit der Unterteilung in „0“ (entspricht einem Nichtraucher), „>0“, „<5“, „<10“, „<20“ und „>20“. Der Alkoholkonsum wurde unterteilt in keinen, mäßig, hoch und unbekannt. Die Anzahl der entnommenen Lymphknoten und wie viele von diesen befallen war, diente auch als Unterscheidungskriterium. Zusätzlich erfolgte eine Unterteilung in HPV- positiv und –negativ und ob es sich um eine klinische oder pathologische Diagnose handelte. Neben der TNM- und UICC-Klassifikation wurde auch das Grading beachtet. Lag letzteres nicht vor, so wurde dies eigenständig an den TMAs vorgenommen. Es wurde auch die Lymphgefäßinvasion, die Perineuralscheideninvasion und die Veneninvasion berücksichtigt. Die letzten Kriterien bezogen sich auf die angewandte Therapie. So wurde zum einen unterschieden ob es sich um eine kurative oder palliative Therapie handelte. Zum anderen wurde die Art der Therapie unterteilt in Operation, Induktionschemotherapie, Radiatio, Radiochemotherapie und Immuntherapie. Bei angewandten Chemotherapien erfolgte eine Angabe über die Anzahl der Chemozyklen.

Zusätzlich fand ein Ausschluss an TMAs statt, welche nicht vollständig als Core ausgestanzt wurden. Zudem wurden TMAs, bei denen es sich um Lymphknoten handelte, von der Bewertung ausgeschlossen.

## 3.2 Grundprinzip der Immunhistochemie

Die angewendeten Färbungen beruhen auf dem Prinzip der Immunhistochemie. Hierbei kommt es zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen dem Epitop auf dem Gewebeschnitt und einem sich in der Färbung befindenden Antikörper, an den ein Detektionssystem gekoppelt ist.

Unterschieden wird zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern. Erstere stammen von einer Plasmazelle und richten sich somit gegen ein bestimmtes Epitop, wohingegen polyklonale Antikörper von unterschiedlichen Plasmazellen abstammen und mehrere Epitope darbieten. Die in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper sind hauptsächlich der Gruppe der Gamma-Immunglobuline zugehörig und zeichnen sich durch ihren Y-förmigen Aufbau aus. Sie verfügen über ein variables Fab-Teil (Fragment Antibody-binding), an welchem es zur Bindung des Epitops kommt, und ein konstantes Fc-Teil (fragment constant).

Da Antikörper zu der Klasse der Proteine zählen, ist auf ein optimales Reaktionsmilieu zu achten. Dies kann unter anderem durch den TRIS-Puffer erzielt werden, welcher schlussendlich für ein optimale Salzkonzentration und einen optimalen pH-Wert sorgt.

Besonders relevant ist diese Art der Färbung für die Tumordiagnostik. So kann nicht nur festgestellt werden inwiefern ein histologischer Schnitt Tumorzellen enthält, sondern auch wie diese differenziert sind [74].

### 3.2.1 Ki67-, Taspase1- und VDR-Färbung

Ki67 ist ein Protein bzw. ein Antikörper, welcher als Proliferationsmarker eingesetzt werden kann. Das Antigen hierzu wird in den Phasen G1, G2, S und in der Mitose exprimiert. Die Verteilung des Proteins ist jedoch keineswegs konstant, sondern ist abhängig von der Phase des Zellzyklus. So wird in der G1 Phase Ki67 in dem gesamten Nukleoplasma exprimiert, während der Ort des Vorkommens des Proteins in der S-Phase derzeit noch stark diskutiert wird. Hieraus ergibt sich, dass Wachstumsvorgänge besonders gut durch die Verwendung des Ki67-Antikörpers gekennzeichnet werden können. Dies ist vor allem bei der Tumordiagnostik relevant, da sich durch die Verwendung des Ki67-Antikörpers eine Vorhersage über die Proliferationsaktivität des Tumors tätigen lässt. Zudem kann dieser Markierungsindex als prognostischer Faktor fungieren, vorausgesetzt Staging und Grading des Tumors werden auch berücksichtigt [75].

Taspase1 bzw. Threonin-Aspartase1 zählt zu den Proteasen und ist insbesondere relevant für die Spaltung des Proteins Mixed-Lineage Leukemia (MLL). Jenes ist relevant für die

Regulierung der Genexpression und der Zelldifferenzierung. Durch Fehlsplattungen entstandene MLL-Fusionsproteine sind mit bestimmten Formen der Leukämie assoziiert. Aufgrund seiner Rolle auf molekularer Ebene, wurde Taspase1 hinsichtlich diverser Krebserkrankungen untersucht. Eine Fehlfunktion bzw. Überexpression der Protease kann zu unkontrolliertem Zellwachstum und somit mit einer Tumorerkrankung in Verbindung stehen [76]. Taspase1 gilt hier als Vergleichs-Tumormarker zu VDR.

### 3.2.2. HE-Färbung

Die HE-Färbung (kurz für Hämatoxylin-Eosin-Färbung) dient in dieser Studie als Übersichtsfärbung, um somit einen groben Überblick über das Gewebe und die Anfärbbarkeit eben dieses zu erhalten. Der farblose Bestandteil Hämatoxylin oxidiert während des Färbvorgangs zu dem sauren Farbstoff Hämatein, welches die Zellkerne blau bzw. violett anfärbt. Diese Oxidation kommt durch den Luftsauerstoff oder durch die zusätzliche Verwendung von Oxidanzien zustande. Eosin (chemisch Tetrabrom-Fluorescein) ist ein negativ geladener Farbstoff, welcher eine Ionenbindung zu positiv geladenen Plasmaproteinen aufbaut und diese somit anfärbt. Auf diese Weise werden Bindegewebe, Kollagenfasern und Cytoplasma rot gefärbt. Da auch Kernstrukturen diesen Farbstoff annehmen, kommt es hierbei zu einer Mischung mit dem blauen Farbstoff Hämalaun [74].

### **3.3 Untersuchungsmaterial**

#### **3.3.1 Gewebeprozessierung**

Nach der Entnahme wird die Probe in einem verschließfähigen Gefäß mit einer 5%igen Formalin-Lösung versendet. Es folgt die Fixierung, um das Gewebe vor autolytischen Prozessen zu schützen. Dies kann zum einen physikalisch, durch Einfrieren, oder chemisch erfolgen. Als chemische Fixierungsmittel kommen verschiedene Lösungen in Frage, wie beispielsweise Alkohol oder Formalin. Anschließend wird das Gewebe eingebettet. Hierbei füllt die verwendete Fixierflüssigkeit, die zuvor mit Gewebewasser ausgefüllten, Hohlräume aus. Zunächst wird dem Gewebe ein Überschuss an Alkohol zugeführt, sodass die Gewebeflüssigkeit durch Alkohol ersetzt wird. Dieser wird nun gegen ein Lösungsmittel, in den meisten Fällen Xylol, ausgetauscht. Dieser Schritt ist notwendig, da Alkohol und die Fixierflüssigkeit, in den meisten Fällen wird Paraffin verwendet, sich nicht gut mischen. Das Paraffin wird schonend erhitzt und kann somit in das Gewebe eindringen, durch das Abkühlen verfestigt es sich anschließend. Die eingebetteten Präparate werden nun mittels eines Mikrotoms geschnitten, wobei hauchdünne Schnitte entstehen. Für die Lichtmikroskopie werden Schnitte mit einer Dicke von 0,5 und 60µm und für die Elektronenmikroskopie werden Schnitte zwischen 0,5 und 0,01µ angefertigt. Der Block wird auf die Präparateebene gestellt und auf einem Messer vorgeschoben. Anhand einer Skala kann die Dicke der Schnitte eingestellt werden. Schnitte, die für die Lichtmikroskopie bestimmt sind, werden daraufhin auf einen Objektträger aufgebracht. Nach der Färbung werden die Schnitte mit Harz fixiert und mit einem Deckgläschen versehen [74, 77, 78].

##### **3.3.1.1 Antigendemaskierung**

Aufgrund der Fixierung mit Formaldehyd kann es zu einem reversiblen Verlust an Immunreaktivität kommen, da Epitope beschädigt werden. Diese können durch die Antigendemaskierung, auch Epitop-Retrieval-Methode, wiederhergestellt werden. Hierbei kommen enzymatische Verdauungen zur Anwendung, welche in Kombination mit Dampfhitze die Epitope renaturieren [79].

##### **3.3.1.2 Envision-Methode**

Die Envision-Methode beschreibt einen zweistufigen Vorgang, bei dem nach der Gabe eines Antikörpers ein Konjugat aus bis zu 15 sekundären Antikörpern appliziert wird. Die sekundären Antikörper sind an ein Dextran-haltiges Rückgrat gebunden, das bis zu 100 HRP-Moleküle enthält, bei welchen es sich um farbgebende Enzyme handelt [80].

Diese Methode zeichnet sich durch ihre hohe Spezifität gegenüber anderen Zwei-Schritt-Methoden aus, da sich hier mehr Marker auf dem Gewebe befindet und somit besser detektiert werden kann. Jedoch kann es aufgrund einer potenziellen Schädigung des Gewebes und einer hieraus resultierenden verringerten Intensität der Färbung zu einer vermehrten Hintergrundfärbung kommen [81].

### 3.3.2 Tissue Microarray (TMA)

In der vorliegenden Dissertation wurden sogenannte „TMAs“ verwendet. Diese Abkürzung steht für „tissue microarray“ und bezeichnet mehrere Gewebeschnitte mit einem Durchmesser von 0,6 bis 0,8 mm. Zunächst werden aus Paraffin-Blöcken Proben entnommen bzw. gestanzt, die anschließend in zuvor gelöcherte Empfängerblöcke eingebettet werden. Die Proben können jedoch auch mittels eines Klebebandes auf einen Glasobjektträger übertragen werden. Jene Proben werden auch als „cores“ bezeichnet. Bis zu 1000 „cores“ können auf einem Block platziert werden. Da manche Objektträger empfindlich gegenüber Antigendegeneration und –oxidation sind, werden sie mit Paraffin beschichtet und in geschlossenen Stickstoffkammern aufbewahrt. Die meisten Einrichtungen verwenden zusätzlich ein Qualitätskontrollsystem, da es aufgrund der Schnitte zu einer Veränderung der dreidimensionalen Strukturen kommen kann. Mittels dieses Verfahrens können große Mengen an Proben gleichzeitig verarbeitet werden [74, 82].

Die Verwendung von TMAs stellt eine große Ersparnis an Zeit und Ressourcen dar. So können mehrere Proben in einem Durchgang gefärbt werden, was wiederum zu einer geringeren Variabilität an Färbeintensitäten führt. Von Nachteil ist jedoch, dass bei einer Coregröße von 6mm es sich als schwierig herausstellt die Tumor-Stroma-Interaktion zu deuten. Zudem war oftmals nur eine geringe Menge an Gewebe in Paraffin befestigt worden, was dazu führte, dass einige Cores nicht ausgestanzt werden konnten. Dies betraf 21 Cores.

Auf den hier verwendeten Objektträgern befinden sich zwischen 22 und 122 Cores, wovon 2 Cores ausschließlich Skelettmuskel beinhalteten und somit als Kontrolle galten. Insgesamt wurden 5 TMA-Blöcke angefertigt und jeweils mit VDR bzw. Ki67 und Taspase1 gefärbt, sodass in Summe 15 gefärbte Schnitte entstanden.

### 3.4 QuPath

„QuPath“, kurz für quantitative Pathologie und entwickelt von der Universität Edinburgh, ist eine Open Source Software, welche es seinen Anwendern erlaubt ganze Objektträger reproduzierbar und digital zu analysieren. Das erwähnte System verfügt neben der Möglichkeit Gewebeproben zu visualisieren, auch über andere Werkzeuge, wie beispielsweise die Unterteilung von Zellen in Tumor- und Stromazellen. Neben der Klassifizierung können Objekte auch durch Messungen und Verknüpfungen dargestellt werden. Zudem kann das Vorhandensein und die Ausprägung von Biomarkern beurteilt werden. Diese Funktion ist zum einen vorgegeben, zum anderen kann sie individuell von dem Anwender bearbeitet werden, um so eventuelle Fehler zu verbessern und auf eigene Wünsche einzugehen. Entwickelt wurde es ursprünglich, um in immunhistochemisch gefärbten und mit Formaldehyd fixierten Paraffin- Schnitten von Tumoren Biomarker zu analysieren. Die Analyse beinhaltet nicht nur das Vorhandensein der Biomarker, sondern auch die Lokalisation sowie die Expressionsstärke [83-85].

#### 3.4.1 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Zur Auswertung der Färbungen wurde das Programm „QuPath“ in der Version 0.3.2 verwendet. Zunächst wurden 33 Schnitte in das Programm eingefügt. Bei 16 Schnitten handelte es sich um Färbungen mit dem Ki67- bzw. Taspase1-Antikörper, wobei bei 17 Schnitten VDR als Antikörper verwendet wurde. Zunächst wurde für jeden Schnitt eine Annotation angefertigt. Hierbei wurde für jeden histologischen Schnitt eine bestimmte Stelle ausgewählt, welche sowohl augenscheinlich Tumor- als auch Stromazellen enthalten hat. Anschließend wurde dem Programm der Befehl erteilt alle Nukleoli und Zellgrenzen zu markieren. Damit es zu einer fundierten Unterscheidung zwischen Tumor- und Stromazellen kommen konnte, musste ein „Classifier“ eingerichtet werden. Um einen „Classifier“ zu erstellen, werden Bereiche innerhalb eines Schnittes ausgewählt und als Stroma bzw. Tumor gekennzeichnet. Daraufhin kann das Programm selbstständig zwischen den Zellen unterscheiden. Darüber hinaus wurden drei „Thresholds“ eingerichtet. Jene erlauben eine Aussage darüber, wie stark die Zellen auf die Färbung angesprochen haben. Da drei „Thresholds“ etabliert wurden, entstand die Einteilung „hoch“, „moderat“ und „niedrig“. Diese Einteilung traf auf Stroma- als auch Tumorzellen zu. Zudem wurde von dem Programm der „H-Score“ berechnet, welcher Aufschluss darüber gibt, wie stark alle Zellen insgesamt auf die Färbung reagiert haben. Dieser berechnet sich folgendermaßen: Der Prozentsatz der Zellen, die stark reagiert haben, wird mit 3 multipliziert, die Zellen, welche moderat reagiert haben, werden mit 2 multipliziert und jene, die gering auf die Färbung angesprochen haben, werden

mit 1 multipliziert. Es ergibt sich hieraus eine Spanne von 0-300. Liegt der Wert bei 0, so hat keine Zelle auf die Färbung reagiert. Liegt dahingegen der Wert des H-Scores bei 300, so haben alle Zellen auf die Färbung angesprochen.

$$\text{H-Score} = 100 \times \left( 1 \times \frac{N_{\text{Tumorzellen schwach}}}{N_{\text{Tumorzellen total}}} + 2 \times \frac{N_{\text{Tumorzellen moderat}}}{N_{\text{Tumorzellen total}}} + 3 \times \frac{N_{\text{Tumorzellen stark}}}{N_{\text{Tumorzellen total}}} \right)$$

Zusätzlich wurden 15 TMA-Schnitte in das Programm eingefügt. Je 5 Schnitte waren hier einer Färbung zugeordnet. Grundsätzlich wurde hier ähnlich verfahren wie zuvor beschrieben. Jedoch müssen TMAs zunächst in einem Raster angelegt werden, sodass „QuPath“ diese auch als TMAs erkennt und entsprechend beschriften kann. Die Beschriftung erfolgt von links nach rechts indem Zahlen verwendet werden, bei den hier verwendeten Schnitten reichten die Zahlen von 1-13. Von oben nach unten erfolgte dann eine Beschriftung mittels des Alphabets, hier wurden die Buchstaben von A bis J verwendet. Demnach erhielt jedes Core eine eindeutige Bezeichnung.

### 3.4.2 Referenzgewebe gesunder Probanden

Für den Vergleich zwischen der Expression von VDR, Taspase1 und Ki67 in Bezug zu gesunden Probanden wurde ein Gewebeschnitt aus dem Kopf-Hals-Bereich entnommen. Zu den Lokalisationen zählten der Oropharynx, der Weichgaumen inklusive der Uvula, die Rachenhinterwand, die Tonsilla palatina und die Vallekula mit der Epiglottis. Diese wurden ebenso wie die anderen Schnitte mit Ki67, VDR, Taspase1 und HE gefärbt. Auf den TMA-Blöcken befanden sich jeweils zwei Skelettmuskelproben, die als Kontrolle galten. Die Auswertung erfolgte bei allen Schnitten unter den gleichen Voraussetzungen.

### 3.5 statistische Auswertung

Die Vorbereitung der statistischen Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Microsoft® Excel® für Office 365. Zunächst wurden die Ergebnisse, welche „QuPath“ errechnet hatte, in eine Tabelle, mit samt dem Verhältnis von gefärbten Stroma- bzw. Tumorzellen übertragen. Die eigentliche statistische Analyse wurde mit „Prism“ in der Version 8.0.2 von dem Unternehmen GraphPad durchgeführt. Zunächst erfolgte die deskriptive Statistik, wobei im Anschluss für alle verfügbaren Parameter die Häufigkeitsverteilungen bestimmt wurden. Daraufhin wurde mittels des Chi-Quadrat-Tests eine explorative Datenanalyse vorgenommen, bei kleinen erwarteten Häufigkeiten wurde der exakte Test nach Fisher angewandt. Qualitative Merkmale wurden weitergehend auf ihr Verteilungsmerkmal hin untersucht, hierbei wurden die Mittelwerte, Mediane, Varianzen, die Minima und Maxima sowie die Standardabweichungen bestimmt. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Waterfall plots, Histogrammen und Boxplots.

Die Schätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit des gesamten Patientenkollektivs erfolgte nach Kaplan-Meier, zusätzlich wurde der Einfluss unterschiedlicher Faktoren anhand des Logrank-Tests und der Cox-Regression untersucht.

Mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests und des Shapiro-Wilk-Tests wurde die Normalverteilung und zusätzlich mit dem Levene-Test die Varianzhomogenität getestet. Im Anschluss folgte der Mann-Whitney-U-test zum Vergleich stetiger Merkmale der Subgruppen. Zudem erfolgte eine Korrelationsanalyse mittels des Korrelationskoeffizienten nach Bravais-Pearson.

Die statistische Auswertung wurde rein explorativ durchgeführt und fand ohne Kontrolle des globalen Fehlers erster Art statt.

## 4 Ergebnisse

Im ersten Abschnitt werden die deskriptiv ermittelten Parameter der Patientendaten beschrieben. Darauf folgt im zweiten Abschnitt die explorative Auswertung der immunhistochemischen Färbung und der Patientendaten. Da für die TMAs mehr Hintergrundinformationen vorhanden waren als für die einfachen histologischen Schnitte, fand die Auswertung getrennt voneinander statt.

### 4.1 Klinische Daten der TMAs

Insgesamt lagen TMAs von 185 Patienten vor. Hiervon wurden im Anschluss jene abgezogen, deren Schnitte zu wenig Gewebe enthielten bzw. deren Schnitte ausschließlich Lymphknoten oder peripheres Gewebe enthielten. Somit blieben noch 174 TMAs übrig. Nicht alle enthielten demografische Hintergrundinformationen, dennoch wurden sie in die nachfolgende Statistik inkludiert.

#### 4.1.1 Demografische Angaben

Von 174 für die Studie ausgewählten Patienten waren 51% Männer (88/174) und 32% Frauen (56/174). Bei 30 Patienten lag keine Aussage über das Geschlecht vor. Der Median der Altersverteilung lag bei 61 Jahren, wobei Frauen erstmals im Median mit 60,5 Jahren und Männer mit 61 Jahren erkrankten. Das jüngste Alter betrug 46 Jahre und das älteste betrug 81 Jahre. Zu 41% (52/110) lag das Erkrankungsalter, bei den Patienten bei denen es bekannt war, unter 60 Jahren und zu 58% (58/110) lag es über 60 Jahren (Abb. 3).

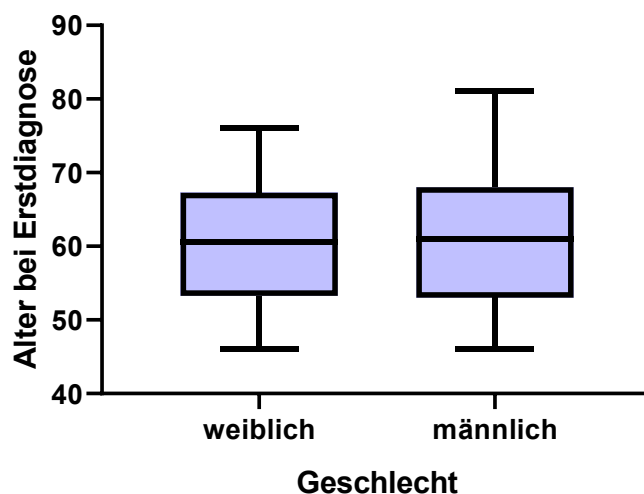


Abbildung 3: Altersverteilung männlicher und weiblicher Fälle

Etwa 70% (121/174) gaben an Raucher zu sein. 13% (22/174) waren Nichtraucher und der Rest tätigte keine Angabe darüber. Als Grenze für massiven Nikotinsonabusus wurde ein Konsum von über 20 „packyears“ festgelegt. Dies betraf 11 Frauen (6%) und 47 Männer (27%). Bei 18% der Männer (32/174) wurde in der Anamnese ein hoher Alkoholkonsum erhoben. Dies betraf zusätzlich 7 Frauen (4%) (Tab.1). Laut WHO handelt es sich um einen mäßigen Alkoholkonsum insofern weniger als 1,5l Wein oder 3,5l Bier oder 0,45l Spirituosen pro Woche konsumiert werden. Ein hoher Alkoholkonsum bezieht sich somit auf eine entsprechend größere Menge an Alkohol [86].

Tabelle 1: Nikotin- und Alkoholkonsum der Probanden

		weiblich		männlich		gesamt	
<b>Nikotinabusus</b>	unbekannt	0	0%	0	0%	0	0%
	nein	2	7%	12	13%	14	12%
	ja	17	61%	80	87%	97	81%
	> 0 py	6	21%	13	14%	19	16%
	< 5py	0	0%	3	3%	3	3%
	< 10py	1	4%	2	2%	3	3%
	< 20py	2	7%	2	2%	4	3%
	>20py	9	32%	40	43%	49	41%
<b>Alkoholkonsum</b>	unbekannt	1	4%	21	23%	22	18%
	kein	9	32%	11	12%	20	17%
	mäßig	8	29%	13	14%	21	18%
	hoch	8	29%	32	35%	40	33%

#### 4.1.2 Lokalisation des Primärtumors

Mit 39% befinden sich die meisten Primärtumore in der Tonsilla palatina, darauf folgt mit 27% der Zungengrund. Zu 17% fand sich der Primus in dem Weichgaumen bzw. der Uvula und zu 11% fand sich der Primus im Oropharynx. Mit je 3% findet sich ein Primärtumor in der Rachenhinterwand und der Vallecula bzw. Epiglottis (Abb. 4).

Auch in Bezug auf das Geschlecht finden sich die meisten Tumore in der Tonsilla palatina. Bei dem weiblichen Kollektiv folgt an zweiter Stelle der weiche Gaumen bzw. die Uvula, wohingegen bei dem männlichen Kollektiv die Rachenhinterwand an zweiter Stelle steht.

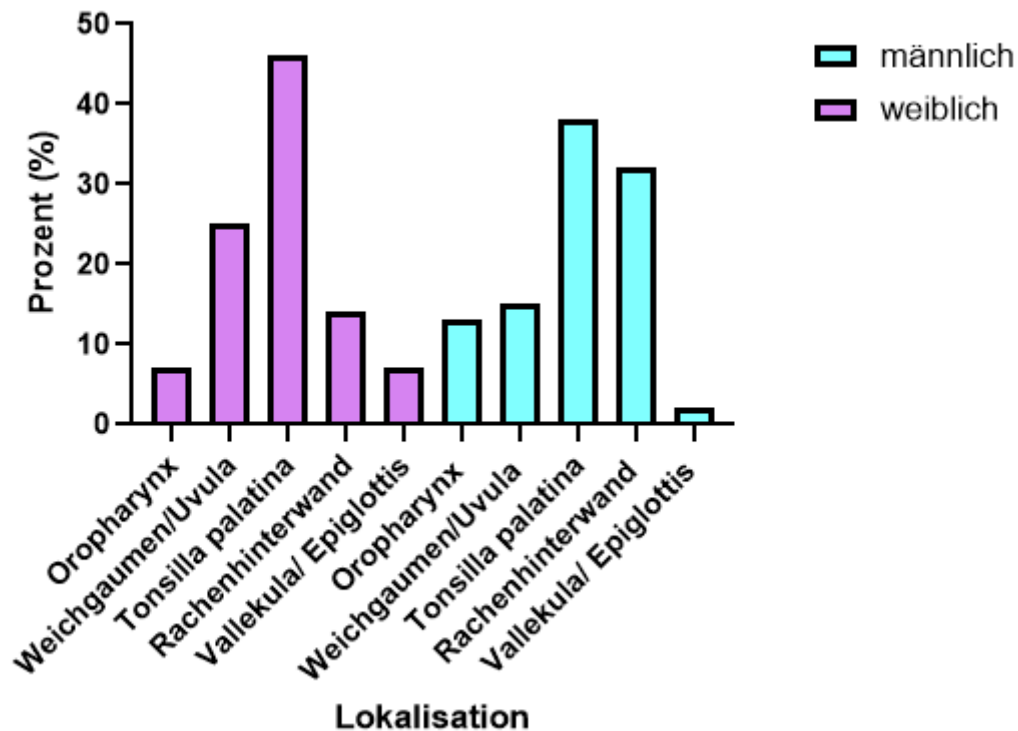


Abbildung 4: Lokalisation des Primärtumors in Bezug auf das Geschlecht

#### 4.1.3 Rezidive

Insgesamt lagen 110 dokumentierte Fälle über das Rezidive vor. Davon waren 19 (17%) Patienten von einem Rezidiv betroffen und 88 (83%) Patienten galten als Rezidiv-frei.

#### 4.1.4 TNM-Klassifikation und UICC-Stadium

Es wurde die, zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Dissertation, aktuellste UICC-Stadien-Einteilung aus dem Jahr 2017 gewählt. In Hinblick auf die TNM-Klassifikation wurde die 8. Auflage, welche 2016 veröffentlicht wurde, gewählt. Bei 114 Patienten erfolgte die Einteilung in das TNM- bzw. UICC-Stadium. Mit Abstand die meisten Tumore (40/114) konnten dem Stadium IV zugeordnet werden, gefolgt von dem Stadium III (16/114) und dem Stadium II (10/114). Tabelle 3 zeigt das Vorkommen von Fernmetastasen und den Befall der Lymphknoten. 10 von 114 Fällen wiesen Fernmetastasen auf, welche hier ab einer T-Klassifikation von 2 vorkamen. 49 der 114 Patienten wurden mit einem T-Stadium von mindestens 3 gestaged. Mehr als die Hälfte der Betroffenen (54%) wiesen ein N2-Stadium auf, in 32 Fällen (28%) lag jedoch ein N0-Stadium vor (Abb. 5; Tab.3).

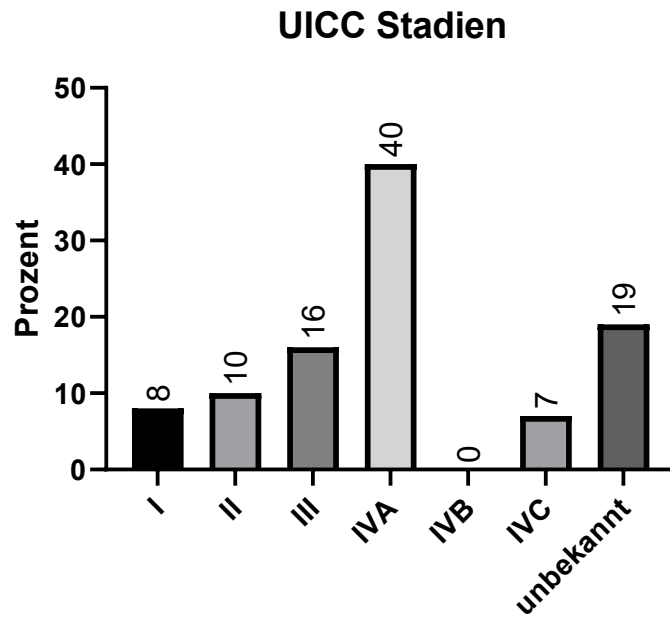


Abbildung 5: Einteilung des Kollektivs in die zugehörigen UICC-Stadien (8.Edition)

Tabelle 2: Einteilung der Primärtumore anhand der TNM-Stadien

		T-Stadium						
		x	0	1	2	3	4a	4b
<b>N</b>	x	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	10	15	7	0	0
	1	0	0	6	7	2	1	0
	2a	0	0	5	1	2	2	0
<b>M</b>	x	0	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	0	38	23	16	0
	1	0	0	0	3	2	5	0
	2c	0	0	1	7	5	9	1

Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung histopathologischer Parameter

<b>extranodales Wachstum ECE</b>	unbekannt	58	33%
	ja	92	53%
	nein	24	14%
<b>Residualstatus R</b>	unbekannt	98	56%
	0	58	33%
	1	16	9%
	2	2	1%
<b>Gefäßinvasion V</b>	unbekannt	151	87%
	negativ	4	2%
	mikroskopisch sichtbar	18	10%
	makroskopisch sichtbar	1	1%
<b>Perineuralscheideninvasion Pn</b>	unbekannt	164	94%
	negativ	2	1%
	positiv	8	5%
<b>Lymphknoteninvasion L</b>	unbekannt	165	95%
	negativ	7	4%
	positiv	2	1%
<b>Grading G</b>	I	6	3%
	II	97	56%
	III	71	41%

Mehrheitlich handelte es sich um mäßig differenzierte Primärtumore (97/174). 41% der Tumore wiesen einen geringen Differenzierungsgrad auf, wohingegen lediglich in 6 Fällen ein hoher Grad an Differenzierung vorlag. Tabelle 4 kann neben dem Grading auch der Resektionsstatus entnommen werden. Dieser wird in 3 Subgruppen gegliedert. Ein R0 Status, welcher in ein Drittel der Fälle vorlag, entspricht einem tumorfreien Resektionsrand. 16% des Patientenkollektivs wiesen ein R1 Status auf, was einem Resektionsrand entspricht, der mikroskopisch über Tumorzellen verfügt. Ein R2 Status beschreibt einen makroskopisch befallenen Tumorsektionsrand, welcher in 2% der Fälle vorkam. Bei über der Hälfte der Patienten (53%) fand sich im Rahmen der Neck Dissection ein extrakapsuläres Wachstum in den Lymphknotenmetastasen. Die Lymphknoten-, Gefäß- und Perineuralscheideninvasion wurden in den entsprechenden histologischen Schnitten äußerst selten erwähnt weswegen hier nicht auf jene eingegangen wird.

#### 4.1.5 p16 Status

Knapp ein Viertel der Patienten (44/174) mit einem HNSCC Karzinom waren HPV positiv, wohingegen 41% einen negativen HPV-Status hatten. Die meisten HPV positive Fälle traten bei Tumoren in der Tonsilla palatina auf (31/44). Darauf folgte mit 10 HPV assoziierten Tumoren der Zungengrund und mit 2 HPV assoziierten Tumoren die Uvula. Alle weiteren

Tumore waren entweder frei von HP-Viren oder verfügten über keine Information über den HPV-Status (Abb. 6).

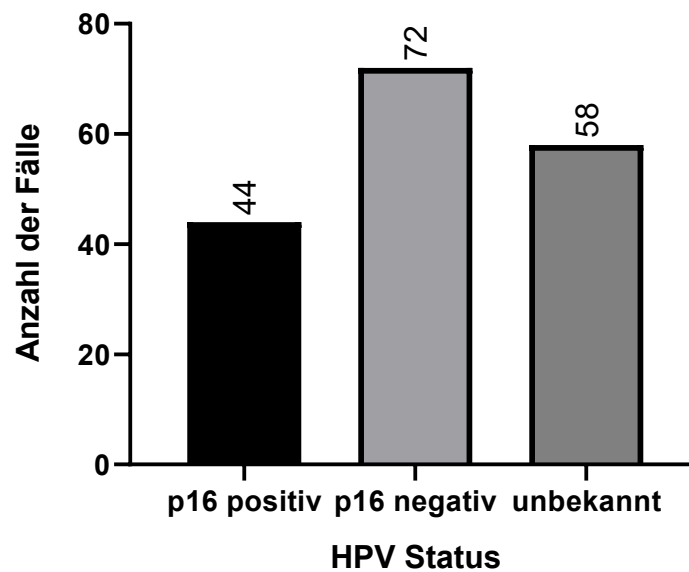


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung des HPV-Status des Patientenkollektivs

#### 4.1.6 Therapie

Die Therapiemöglichkeiten beinhalteten Operationen, Induktionschemotherapien, Bestrahlungen, Radiochemotherapien und Immuntherapien. In 3 Fällen wurde eine palliative Behandlung angestrebt, wohingegen in 113 Fällen eine kurative Therapie durchgeführt werden konnte. 41% der Patienten erhielten eine Operation, was somit die häufigste Therapie der Wahl darstellte. Daraufhin folgte die Chemotherapie, welche in 8% der Fälle durchgeführt wurde und zu 6% aus einem einzigen Zyklus bestand. Die Radiochemotherapie wurde in 4% der Fälle durchgeführt und in einem einzigen Fall fand eine Radiatio statt (Tab.5).

Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung verfolgter Therapiekonzepte, RCT= Radiochemotherapie, OP= Operation

<b>OP</b>	ja	71	41%
	nein	45	26%
	unbekannt	58	33%
<b>Therapie</b>	OP	71	41%
	Induktionsschemo	14	8%
	Radiatio	1	1%
	RCT	7	4%
	Immuntherapie	0	0%
	palliativ	3	2%
	unbekannt	78	45%
	<b>Chemozyklen</b>	0	95
	1	10	6%
	2	2	1%
	3	9	5%
	unbekannt	58	33%

In 70 von 71 Fällen wurde die Operation durch eine Neck dissection ergänzt. Hierbei wurden im Durchschnitt 11 Lymphknoten entfernt, von denen 1,7 befallen waren. Die Anzahl entnommener Lymphknoten reichte von Null bis 51. Der Median der Lymphnode ratio (LNR) lag bei 0,07 mit dem Maximum bei 0,44 und dem Minimum bei 0,02.

#### 4.1.7 Überlebenszeiten

Die Overall Survival (OS) wurde als Differenz zwischen der Erstdiagnose und dem letzten Kontakt bzw. bei Verstreben des Patienten dem Todesdatum berechnet. Die Disease Free Survival wurde aus der Differenz zwischen Erstdiagnosedatum und Rezidivdatum errechnet.

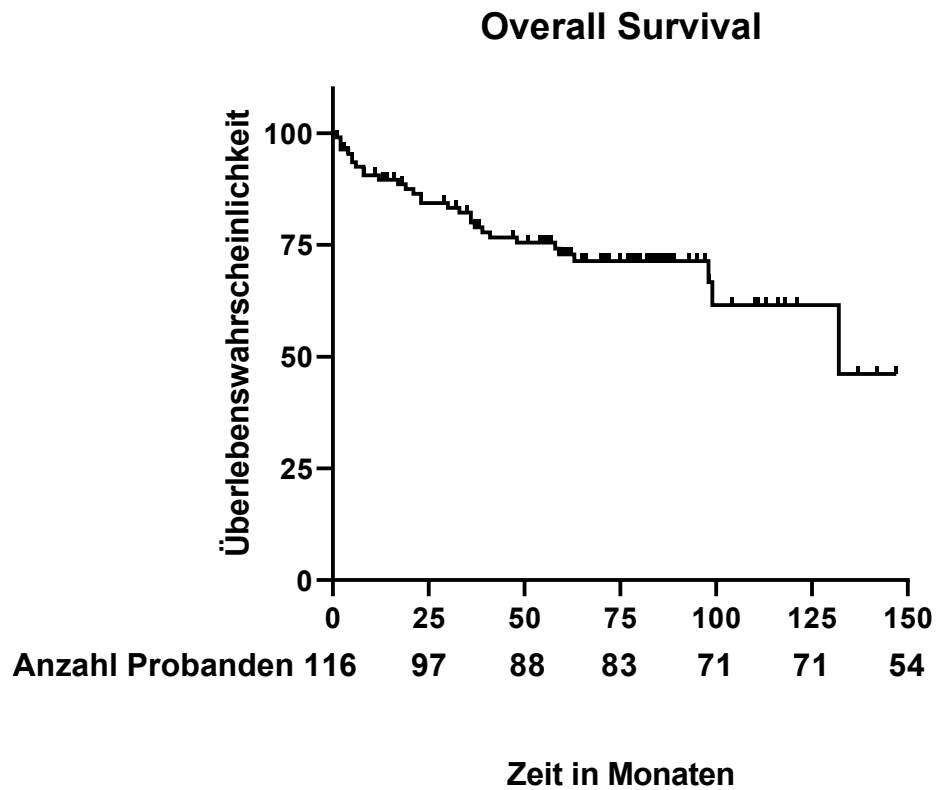


Abbildung 7: Overall Survival nach Erstdiagnose eines HNSCC

Die Spanne des OS reichte von 0 bis 147 Monaten. Der Mittelwert lag bei 53,84 und stimmte somit aufgrund der Schiefe der Verteilung nicht mit dem Median von 57 Monaten überein. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 72,9% (Abb. 7).

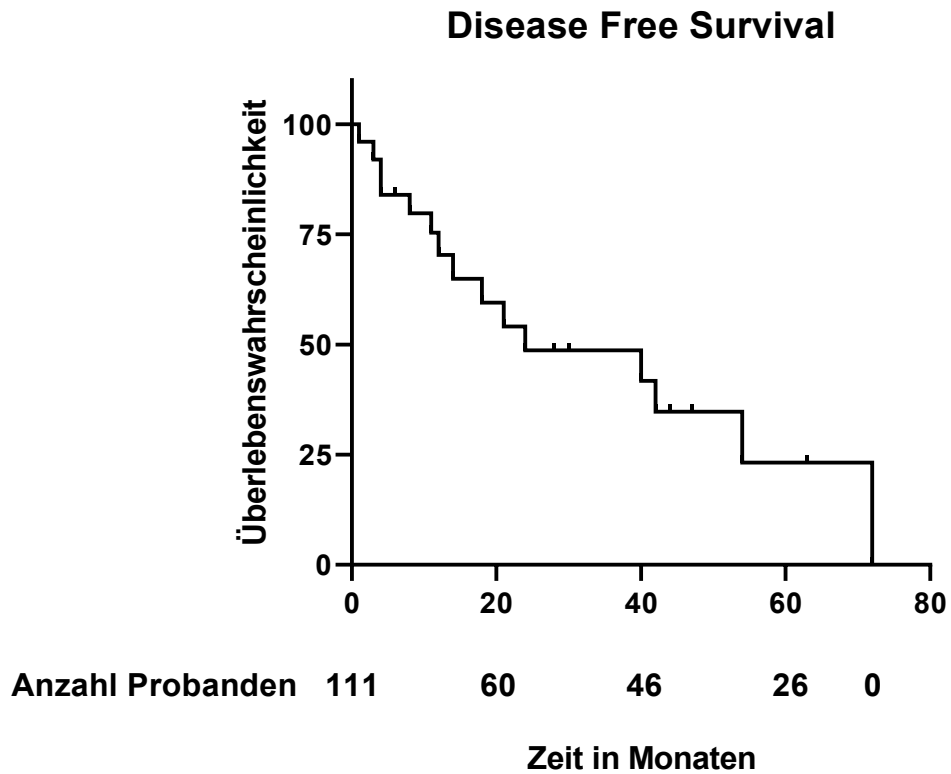


Abbildung 8: Disease Free Survival nach Erstdiagnose eines HNSCC

Das DFS lag zwischen 0 und 72 Monaten mit einem Mittelwert von 21 Monaten. Auch hier stimmt aufgrund der Schiefe der Verteilung Mittelwert und Median (12 Monate) nicht überein. Das 5-Jahres-DFS betrug 25% (Abb. 8).

## 4.2 Deskriptive Analyse der (immun)histochemischen Ergebnisse

Die Blöcke mit den 174 ausgewählten TMAs wurden zweimal geschnitten und jeweils mit VDR-, Taspase1 oder Ki67-Antikörpern gefärbt. Im Schnitt wurden circa 38% der Tumorzellen in der Ki67- Färbung und circa 42% der Tumorzellen in der VDR- Färbung als positiv gewertet. In der Taspase1-Färbung wurden 92% der Tumorzellen als positiv gewertet.

Abbildung 9 zeigt beispielhaft die immunhistochemische Färbung des Gewebes.

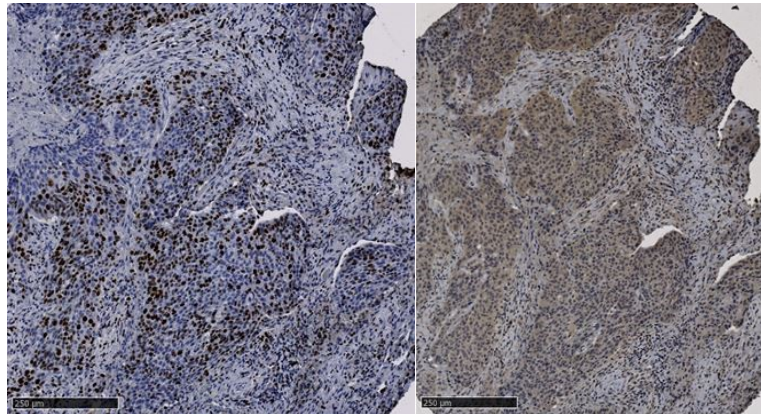


Abbildung 9: Expressionsmuster der immunhistochemisch gefärbten TMA

Abbildung 9 zeigt zwei Ausschnitte des gleichen TMAs. Das linke Bild zeigt die Färbung mit Ki67 und das rechte Bild zeigt das Expressionsmuster unter Verwendung von VDR. In der unteren linken Ecke findet sich ein schwarzer Maßstab mit einer Größe von 250µm.

Tabelle 6 dient der Übersicht der Expressionslevel sowohl in den TMA-Proben mit der VDR- als auch mit der Ki67-Färbung. Tabellen 7,8 und 9 vergleichen die Verteilungsmaße der Expressionslevel von Ki67 und Taspase1. Die Färbungen wurden durchgeführt und mittels der Software „QuPath“ ausgewertet. Neben einem hohen Anteil an ungefärbten Zellen zeigte sich für Ki67 eine gleichmäßige Verteilung der Färbescores (Tab.8). VDR und Taspase1 zeigten ein hohes Vorkommen an stark gefärbten Zellen (Tab. 7 und 9).

Tabelle 5: Expressionslevel aller TMA-Proben

	Ki67				VDR			
	Anzahl aller Tumorzellen	stark	moderat	schwach	Anzahl aller Tumorzellen	stark	moderat	schwach
<b>Mittelwert</b>	5888	891,9	818,7	763,1	6506	1857	528,6	188,5
<b>Median</b>	5726	770	568	481	6131	1644	392	103,5
<b>Standardabweichung</b>	2529	619,7	825,5	948,1	3404	1364	530	245,1
<b>Minimum</b>	147	17	0	0	138	53	5	0
<b>Maximum</b>	13293	3028	5780	5887	20162	8323	3352	1416
<b>25% Perzentil</b>	4271	388,5	182	71	4262	919,5	150,3	37
<b>75% Perzentil</b>	7536	1310	1195	1009	8761	2582	712,3	260

Tabelle 6: Expression der VDR-Färbung

	Häufigkeit	Prozente
<b>ungefärbt</b>	3414,3	58%
<b>schwach</b>	763,1	13%
<b>moderat</b>	818,7	14%
<b>stark</b>	891,9	15%
<b>gesamt</b>	5888	100%

Tabelle 7: Expression der Ki67-Expression

	Häufigkeit	Prozente
<b>ungefärbt</b>	3931,9	60%
<b>schwach</b>	188,5	3%
<b>moderat</b>	528,6	8%
<b>stark</b>	1857	29%
<b>gesamt</b>	6506	100%

Tabelle 8: Expression der Ki67-Expression

	Häufigkeit	Prozent
<b>ungefärbt</b>	562,1	8%
<b>schwach</b>	480,6	7%
<b>moderat</b>	2422,8	37%
<b>stark</b>	3019,5	48%
<b>gesamt</b>	6485	100%

Zusätzlich dient Tabelle 10 dem Vergleich der deskriptiven Statistik ausschließlich bezogen auf die H-Scores der drei Färbungen. Hierbei gilt ein besonderes Augenmerk den jeweiligen Minima und Maxima. Im Vergleich ist die Range des H-Scores bei Ki67 größer als bei VDR. Abbildung 9 soll dies verdeutlichen.

Tabelle 9: Deskriptive Statistik bezüglich der H-Scores der Antikörper

	Ki67	Taspase1	VDR
<b>Minimum</b>	0	14,96	3,344
<b>Maximum</b>	206,1	258,29	181,7
<b>Median</b>	64,18	142,12	51,58
<b>Mittelwert</b>	70,95	149,42	53,42
<b>Standardabweichung</b>	52,9	40,47	32,73

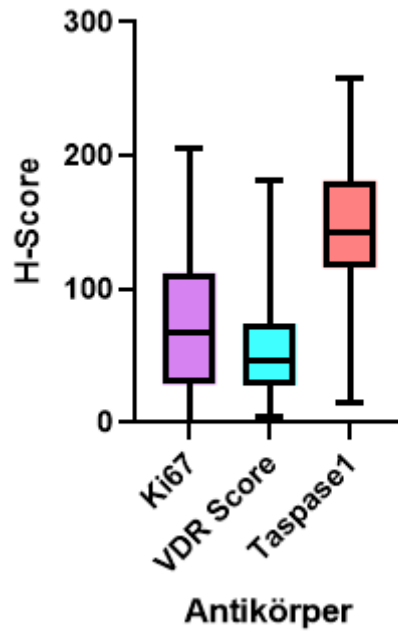


Abbildung 10: deskriptive Statistik der Färbungen

Die folgenden Histogramme (Abb. 10-12) liefern einen Überblick über die Verteilung der H-Scores der drei Färbungen. Die Range des H-Scores ist bei Ki67 größer als bei VDR.

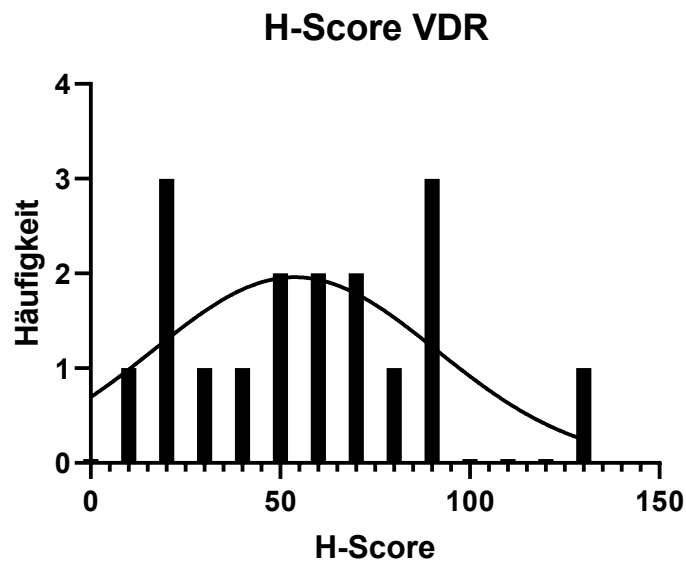


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung des H-Scores der VDR-Färbung

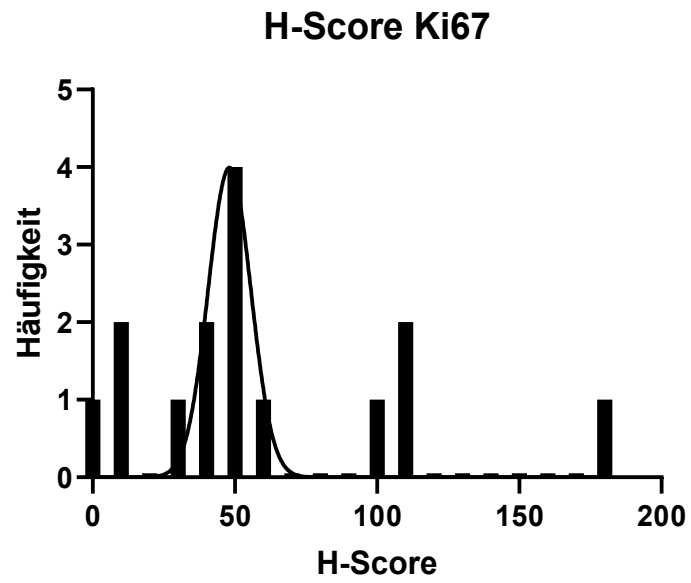


Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung des H-Scores der Ki67-Färbung

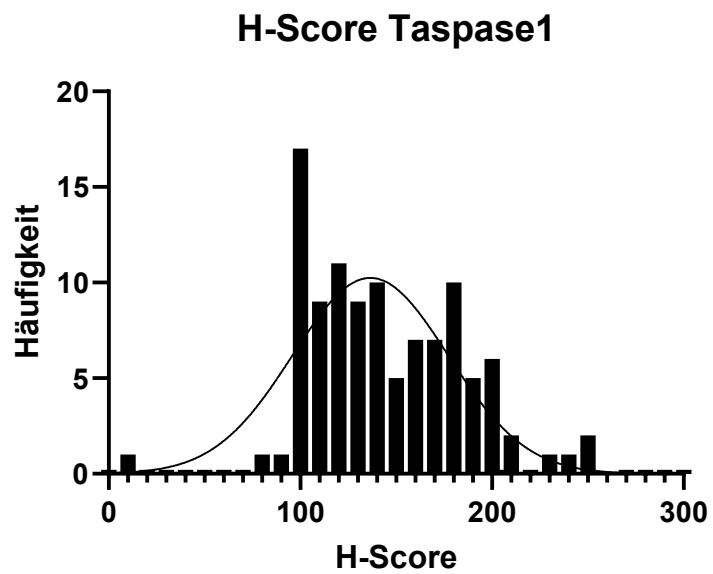


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der H-Scores der Taspase1-Färbung

#### 4.2.1 Unterschiede und Korrelationen zwischen VDR-, Ki67- und Taspase1-Expression und klinischen Daten

Mittels des Mann-Whitney U Tests erfolgte die Untersuchung zwischen der VDR-, Ki67- und Taspase1- Expression und den zugehörigen klinischen Daten. In Bezug auf VDR fand sich nur für den HPV-Status, das UICC-Stadium, die Therapieoptionen und das N-Stadium eine Korrelation. Für Ki67 fand sich in Bezug zu den klinischen Parametern keine Korrelation. Bezüglich Taspase1 konnte eine Korrelation mit dem UICC-Stadium sowie der Lokalisation festgestellt werden.

Für alle weiteren klinischen Parameter konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

Der MWU-Test ergab für die Expression von VDR in Bezug zu HPV relevante Unterschiede. Die Expression des VDR korrelierte dabei invers mit dem HPV-Status ( $p=0,004$ ;  $n=44$ ,  $r= -0,318$ ), siehe Abbildung 13.

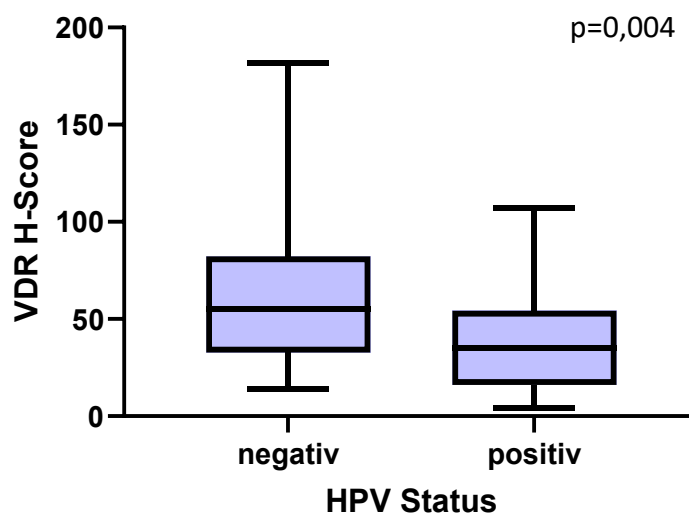


Abbildung 14: Expression von VDR in HNSCC Tumoren in Relation zu dem HPV-Status

Mit einem p-Wert von 0,0293 bzw. 0,0424 ergab sich auch hier eine Korrelation zwischen der Expression von VDR ( $r=0,249$ ) bzw. Taspase1 ( $r=0,350$ ) und der Einteilung der Tumore in die UICC-Stadien (Abb. 14, 15).

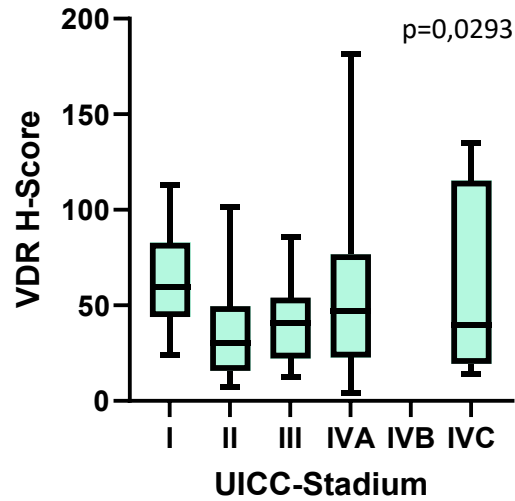


Abbildung 15: Expression von VDR in HNSCC Tumoren in Zusammenhang mit dem UICC-Stadium

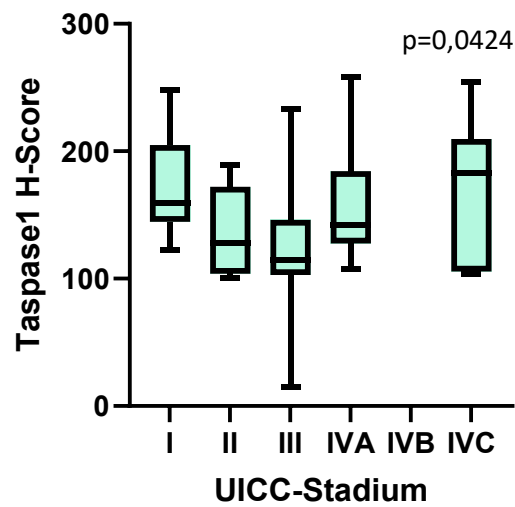


Abbildung 16: Expression von Taspase1 in HNSCC Tumoren in Zusammenhang mit dem UICC-Stadium

Die Therapieoptionen wiesen ebenso eine Korrelation mit VDR auf ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,463$ ), (Abb.16).

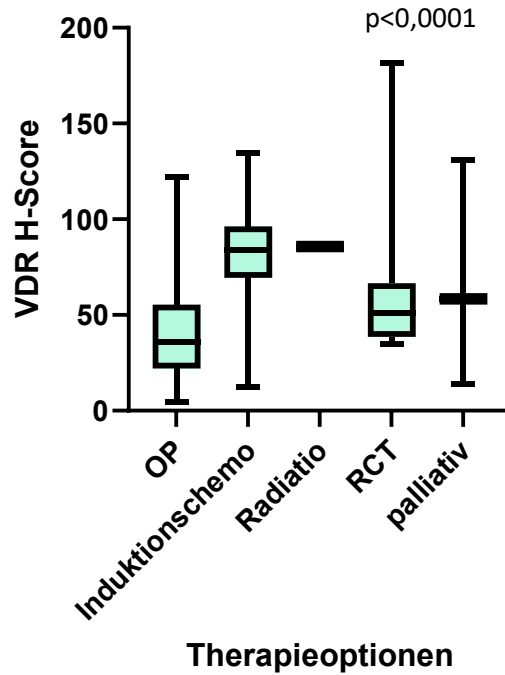


Abbildung 17: Expression von VDR in HNSCC Tumoren in Zusammenhang mit den Therapieoptionen

Auch die N-Stadien zeigten eine Korrelation mit VDR ( $p=0,0124$ ,  $r=0,362$ ). Die größte Range konnte bei Stadium 2c gefunden werden, wohingegen die kleinste Range sich bei Stadium 1 befand (Abb. 17).

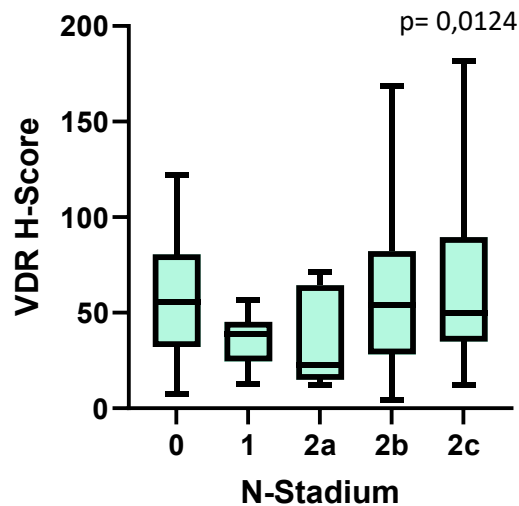


Abbildung 18: Expression von VDR in HNSCC Tumoren in Zusammenhang mit dem N-Stadium

Bei der Expression der Taspase1 in Hinsicht auf die Lokalisation des Primärtumors ergaben sich bei Anwendung des KWT eine signifikante Differenz in Relation zu der Expression von Taspase1 ( $p=0,0089$ ,  $r=0,469$ ). Der Zungengrund und der Weichgaumen bzw. die Uvula zeigten die weiteste Range an H-Scores während in der Epiglottis bzw. der Vallecula die geringste Range vorhanden war (Abb. 18).

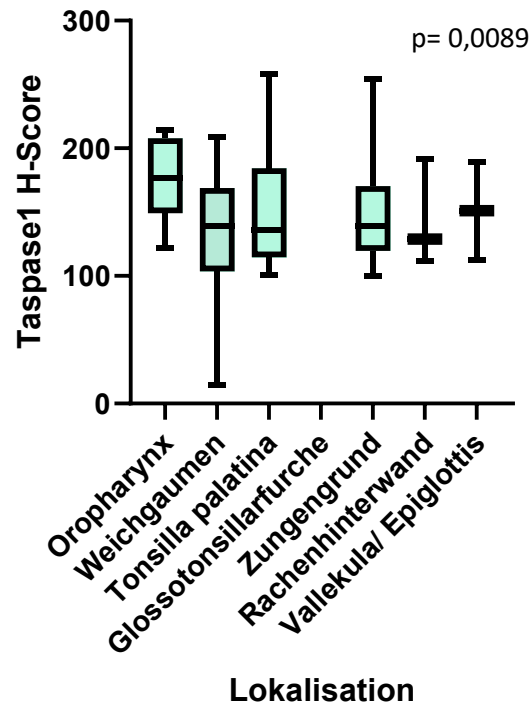


Abbildung 19: Expression von Taspase1 in HNSCC Tumoren in Zusammenhang mit der Lokalisation

#### 4.2.2 Korrelation zwischen der VDR-, Ki67- und Taspase1- Expression

Wie Tabelle 11 zeigt konnte lediglich für eine geringe VDR- und eine hohe Taspase1-Expression eine Korrelation festgestellt werden ( $p= 0,0376$ ,  $r= 0,4563$ ). Alle anderen möglichen Konstellationen wiesen keine statistische Signifikanz auf.

Tabelle 10: Ergebnisse der Korrelationsanalysen zwischen VDR, Ki67 und Taspase1

	VDR gering	VDR hoch	Ki67 gering	Ki67 hoch	Taspase1 gering	Taspase1 hoch
VDR gering	-	-	0,1877	0,2514	0,9633	<b>0,0376</b>
VDR hoch	-	-	0,4910	0,7815	0,9980	0,2301
Ki67 gering	-	-	-	-	0,8714	0,6073
Ki67 hoch	-	-	-	-	0,9444	0,8236

Zwischen einer geringen Expression an VDR und einer hohen Expression an Taspase1 handelte sich hierbei um eine direkte, moderate Korrelation (Abb. 19). Eine geringe Expression von VDR bezog sich hier auf den Median der H-Scores von 47,235, welcher nicht überschritten werden durfte und somit eine geringe Expression charakterisierte. Eine hohe Expression von Taspase1 wurde ab einem Wert von 142,115 festgelegt.

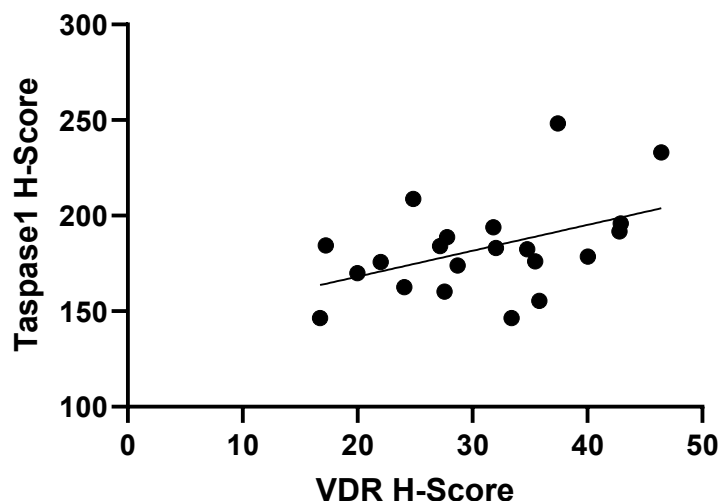


Abbildung 20: Korrelation zwischen VDR- und Taspase1-Expression.

Eine signifikante Korrelation war lediglich im gezeigten Bereich nachweisbar (Details siehe Text).

### 4.2.3 Überlebenswahrscheinlichkeiten

Im Folgenden wurden Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse durchgeführt, um den Einfluss klinischer Parameter zu untersuchen.

Das UICC-Stadium, das T-Stadium, das M-Stadium, die Lokalisation, das Vorhandensein von Rezidiven und die Therapieoptionen beeinflussten die Überlebenswahrscheinlichkeiten.

Somit hatten das Grading, das N-Stadium, der HPV-Status, der Alkohol- und Nikotinkonsum, das Alter, das Geschlecht, der H-Score der VDR-, Ki67- und Taspase1- Färbung keinen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeiten.

Mittels des Logrank-Tests, welcher einen p-Wert von unter 0,0001 ergab, konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten der UICC-Stadien festgestellt werden. Für Stadium III ergab sich ein Median von 99 Monaten, für Stadium IVA ein Median von 132 Monaten und für Stadium IVC wurde ein Median von 15,5 Monaten ermittelt (Abb. 20).

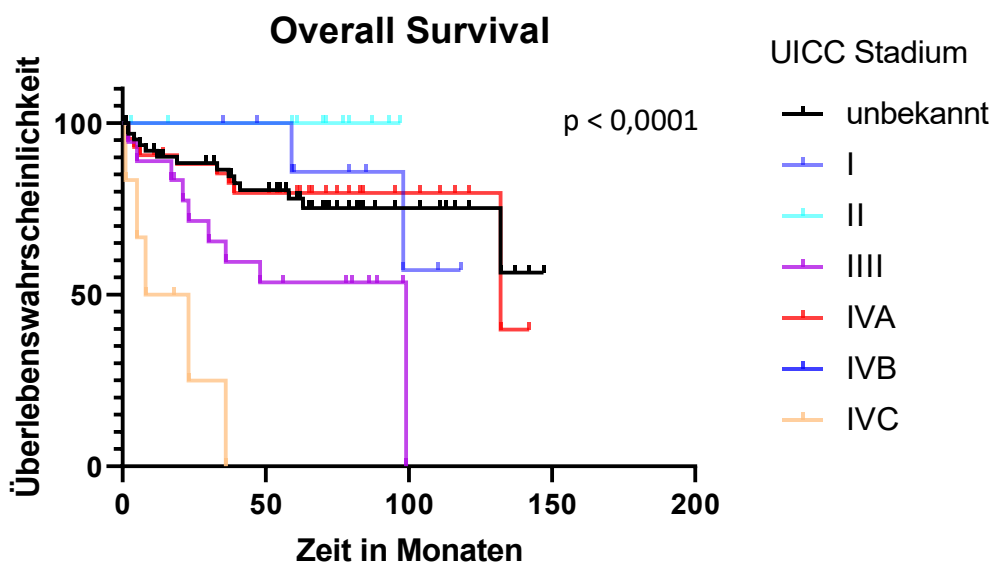


Abbildung 21: Overall Survival in Abhängigkeit des UICC-Stadiums

Auch bei den T-Stadien fand sich ein signifikanter statistischer Unterschied ( $p = 0,0367$ ). Tendenziell zeigten höhere T-Stadien geringere Überlebensraten, wie Abbildung 21 entnommen werden kann. Der Median für Stadium 3 lag bei 58 Monaten, für Stadium 4a bei 132 Monaten und bei Stadium 4b bei 41 Monaten.

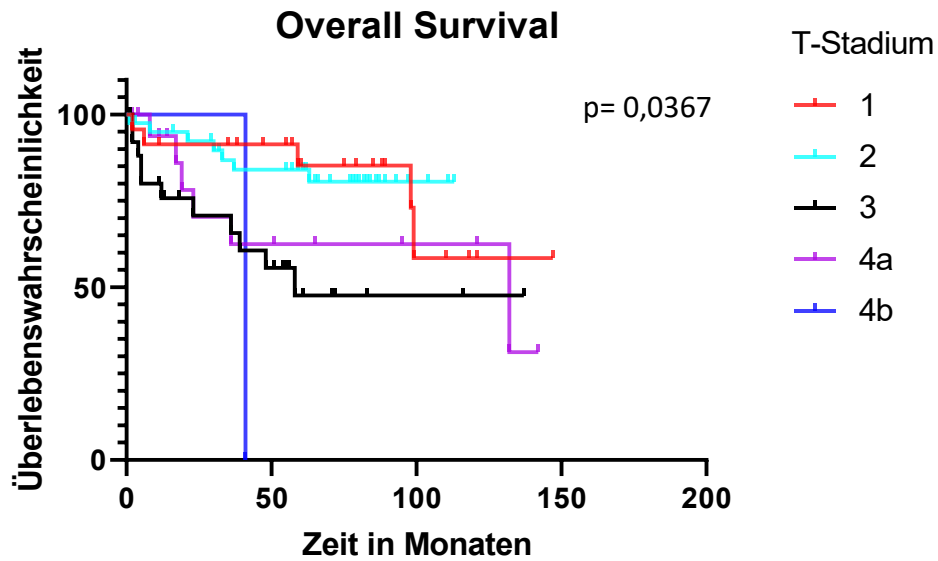


Abbildung 22: Overall Survival in Abhängigkeit des T-Stadiums

Mit einem p-Wert von unter 0,0001 konnten für die Überlebenswahrscheinlichkeiten in Relation zu dem Vorkommen von Fernmetastasen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Median für das Vorhandensein von Fernmetastasen (in Abb. 22 mit der Zahl „1“ gekennzeichnet) lag bei 23 Monaten. Bei einem Fehlen von Metastasen lag der Median bei 132 Monaten.

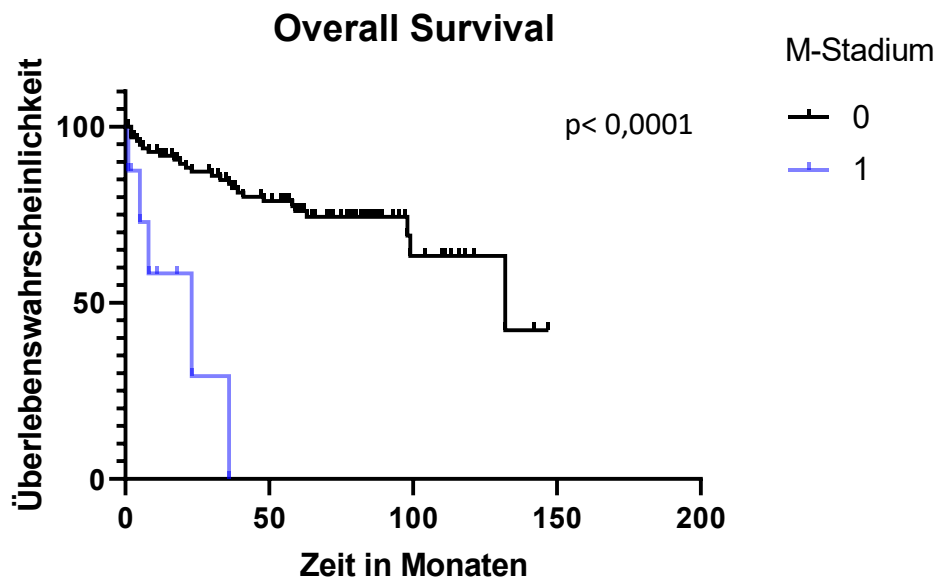


Abbildung 23: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums

Mittels des Logrank-Tests konnte ein signifikanter Unterschied in der Lokalisation und der Overall Survival festgestellt werden ( $p < 0,0001$ ). Für den Weichgaumen bzw. die Uvula lag der Median bei 99 Monaten, für den Zungengrund lag der Median bei 39 Monaten und für die Rachenhinterwand lag der Median bei 5 Monaten (Abb. 23).

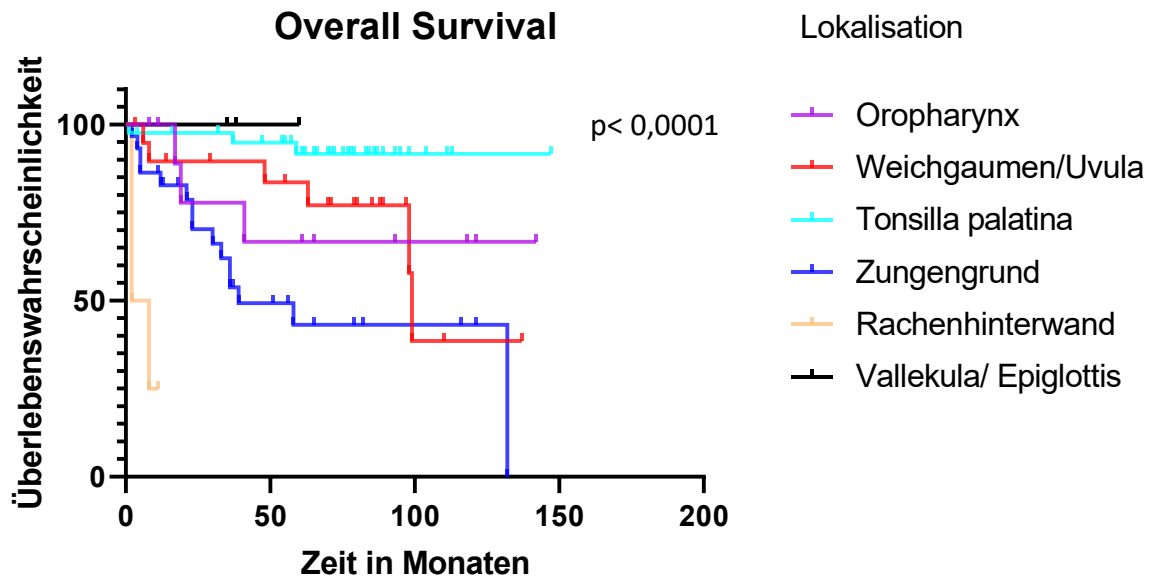


Abbildung 24: Overall Survival in Abhängigkeit der Lokalisation

Auch das Vorhandensein von Rezidiven beeinflusst die Überlebenswahrscheinlichkeit ( $p < 0,0001$ ). Der Median für Rezidive lag bei 43,5 Monaten. Im Vergleich zu dem Fehlen von Rezidiven lag eine geringere 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Rezidiven vor (Abb. 24).

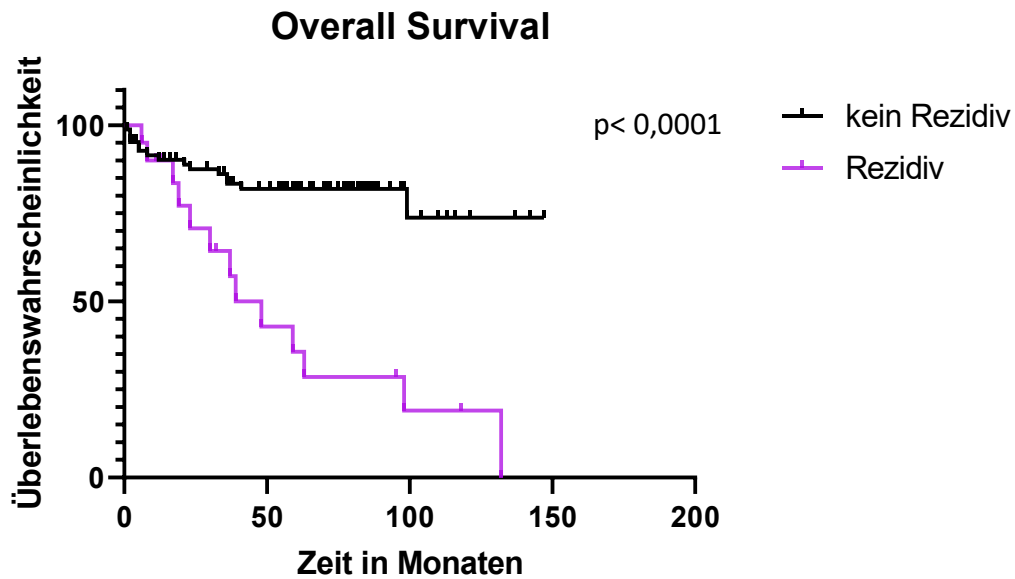


Abbildung 25: Overall Survival in Abhängigkeit des Rezidivdaseins

Mit einem p-Wert von 0,0003 konnte mit Hilfe des Logrank-Tests ein signifikanter Unterschied zwischen den Therapieoptionen und somit ein Zusammenhang zwischen jenen und der Overall Survival festgestellt werden. Für die OP wurde ein Median von 110, für die Induktionstherapie von 95, für die RCT von 65 und für eine palliative Methode von 27,5 berechnet. Die geringste 5-Jahres-Überlebendswahrscheinlichkeit hatte, die palliative Therapieoption ausgeschlossen, die Radiochemotherapie, gefolgt von der Induktionstherapie (Abb. 25).

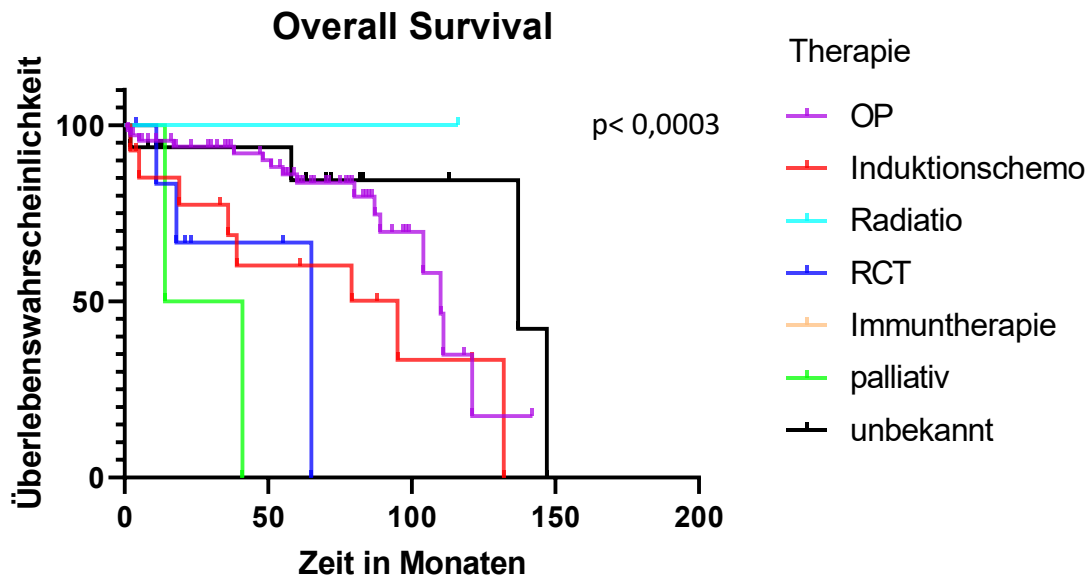


Abbildung 26: Overall Survival in Abhängigkeit der Therapieoptionen

Auch bestand zwischen dem H-Score der VDR-Färbung und der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit kein statistischer Zusammenhang ( $p = 0,2673$ ). Als Grenzwert wurde hier der Median gewählt, welcher bei 47,235 lag. Der Median der Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich einer geringen VDR-Expression lag bei 57 Monaten, der einer hohen Expression lag bei 61 Monaten (Abb. 26).

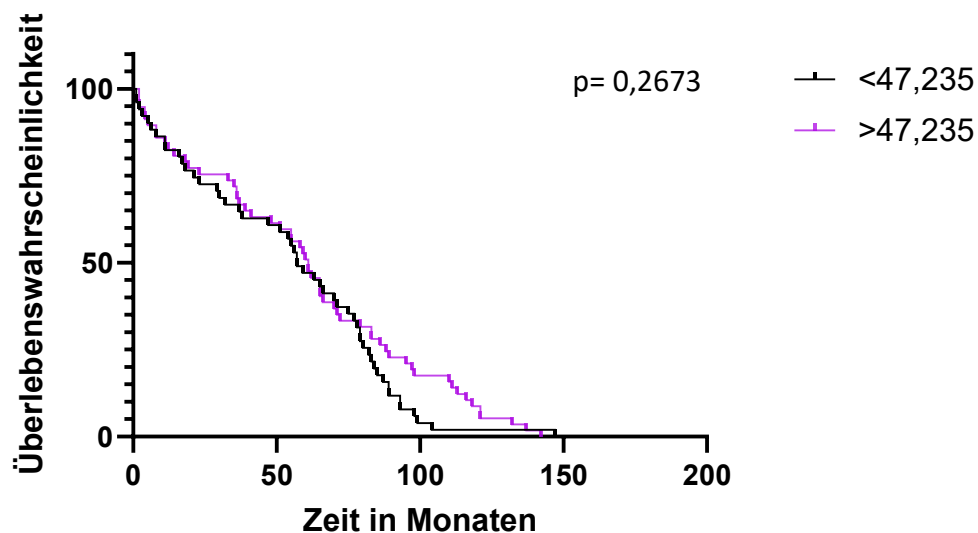


Abbildung 27: Overall Survival in Abhängigkeit des H-Scores der VDR-Färbung

Abbildungen 27 und 28 dienen als Vergleich zu Abb. 26. Auch bezüglich des H-Scores der Ki67 Färbung findet sich kein signifikanter statistischer Zusammenhang zu der Overall Survival

( $p= 0,2675$ ). Der Median der Überlebenswahrscheinlichkeit bezüglich einer geringen Expression an Ki67 lag bei 60,5 Monaten, bei einer hohen Expression an Ki67 lag der Median bei 58 Monaten. Zwischen der VDR und der Ki67 Färbung konnte somit bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit kein Unterschied festgestellt werden.

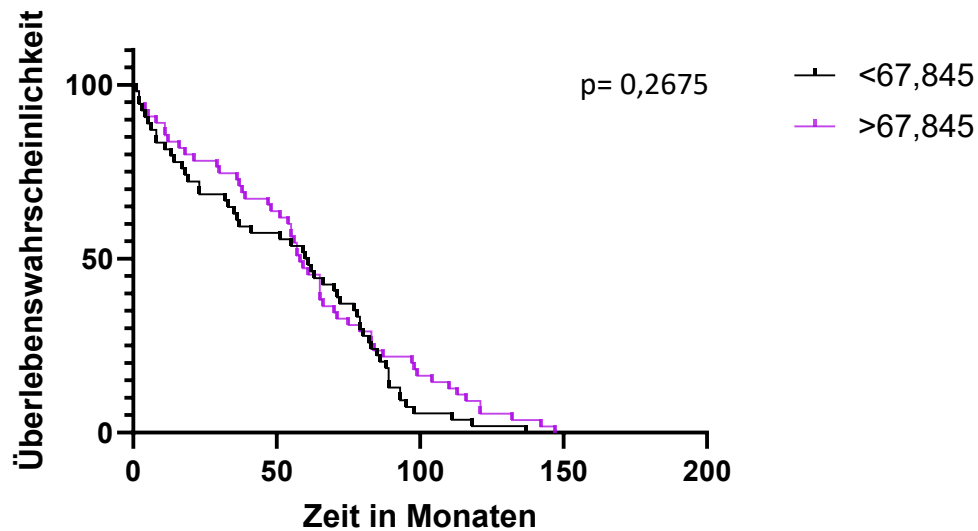


Abbildung 28: Overall Survival des H-Scores der Ki67-Färbung

Auch die Taspase1-Färbung zeigt keine Signifikanz bezüglich der Overall Survival ( $p= 0,5497$ ). Der Median für die Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf eine geringe Expression an Taspase1 lag bei 62 Monaten, bei einer erhöhten Expression an Taspase1 lag sie bei 57 Monaten.

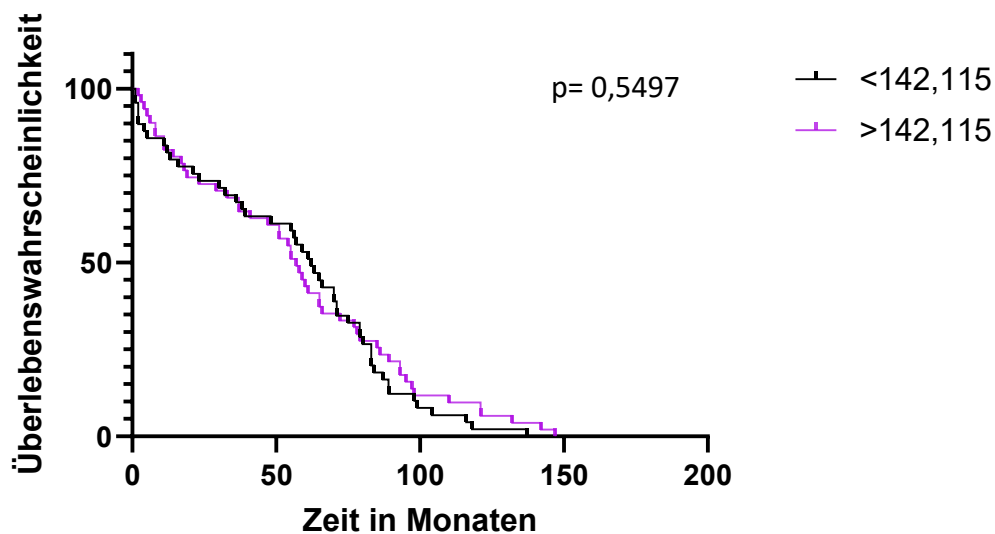


Abbildung 29: Overall Survival des H-Scores der Taspase1-Färbung

## 4.3 Überlebenswahrscheinlichkeiten

### 4.3.1 Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf VDR

Im Folgenden wurden Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse durchgeführt, um den Einfluss klinischer Parameter zu untersuchen. Als Abgrenzung zwischen einer hohen und einer geringen Expression an VDR wurde ein H-Score von 47,235 festgelegt. Bei diesem Wert handelt es sich um den Median aller ausgewerteter H-Scores von VDR. So wurden alle H-Scores, welche unterhalb eines Wertes von 47,235 lagen, als „low“ und alle, die oberhalb des Wertes von 47,235 als „high“ definiert.

Das UICC-Stadium, das T-Stadium, das M-Stadium und die Lokalisation wiesen bei einer niedrigen VDR-Expression eine statistische Signifikanz auf. Die Therapieoptionen, ein potenzieller Nikotinabusus, die Lokalisation und das Geschlecht beeinflussten die Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von einer erhöhten VDR-Expression.

Somit hatten das Grading, das N-Stadium, der HPV-Status, der Alkohol- und Nikotinkonsum, das Alter, das Vorhandensein von Rezidiven, das Geschlecht und die Therapieoptionen bei einer geringen Expression an VDR keine statistische Relevanz. Bei einer hohen Expression an VDR zeigte sich bei dem Grading, dem T-, N-, sowie M-Stadium, dem UICC-Stadium, dem Alkoholabusus, dem Alter, dem HPV-Status und dem Vorkommen von Rezidiven keine Signifikanzen.

Mittels des Logrank-Tests, welcher einen p-Wert von 0,0007 ergab, konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten der UICC-Stadien in Bezug auf eine geringe VDR-Expression festgestellt werden. Bei einem UICC-Stadium von II ließ sich mit 77 Monaten der höchste Median feststellen. Der geringste Median (6,5 Monate) fand sich bei dem Stadium IVC (Abb. 29).

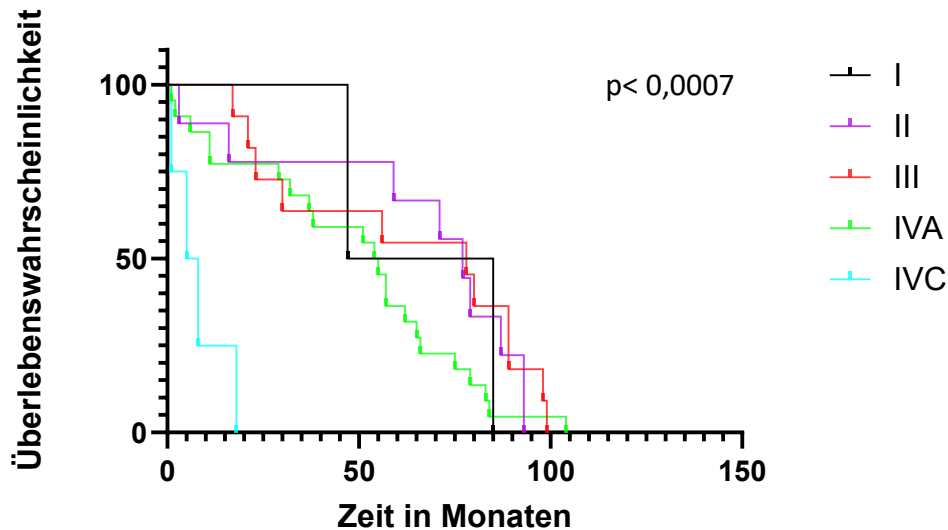


Abbildung 30: Overall Survival in Abhängigkeit des UICC-Stadiums bei einer geringen VDR-Expression

Auch bei den T-Stadien fand sich ein signifikanter statistischer Unterschied ( $p = 0,0001$ ) in Zusammenhang mit einer geringen Expression an VDR. Tendenziell zeigten höhere T-Stadien geringere Überlebensraten, wie Abb. 30 entnommen werden kann. Der niedrigste Median zeigte sich bei Stadium 4a mit 13 Monaten, der größte Median wies das T-Stadium 1 mit 80 Monaten auf.

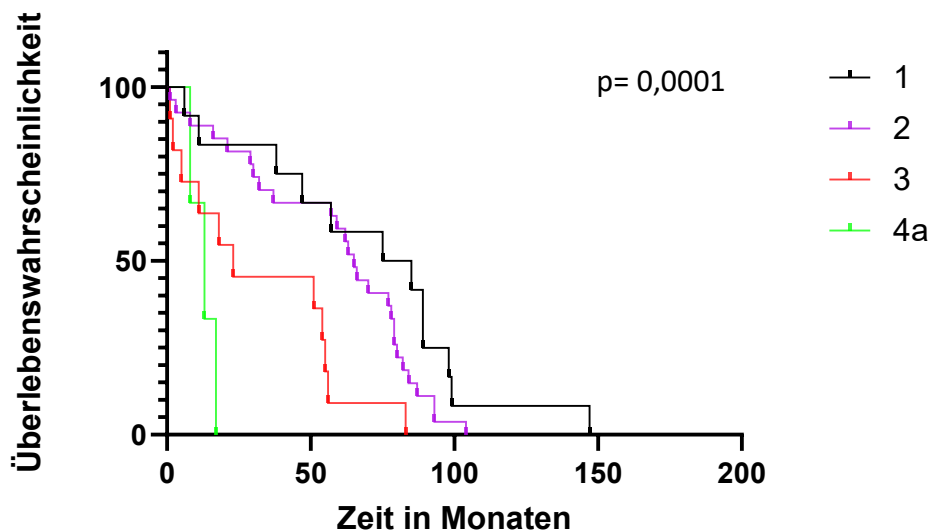


Abbildung 31: Overall Survival in Abhängigkeit des T-Stadiums bei einer geringen VDR-Expression

Mit einem p-Wert von unter 0,0001 konnten für die Überlebenswahrscheinlichkeiten in Relation zu dem Vorkommen von Fernmetastasen bezüglich einer geringen Expression an VDR ein

signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Median für das Vorhandensein von Fernmetastasen lag bei 6,5 Monaten (Abb. 31).

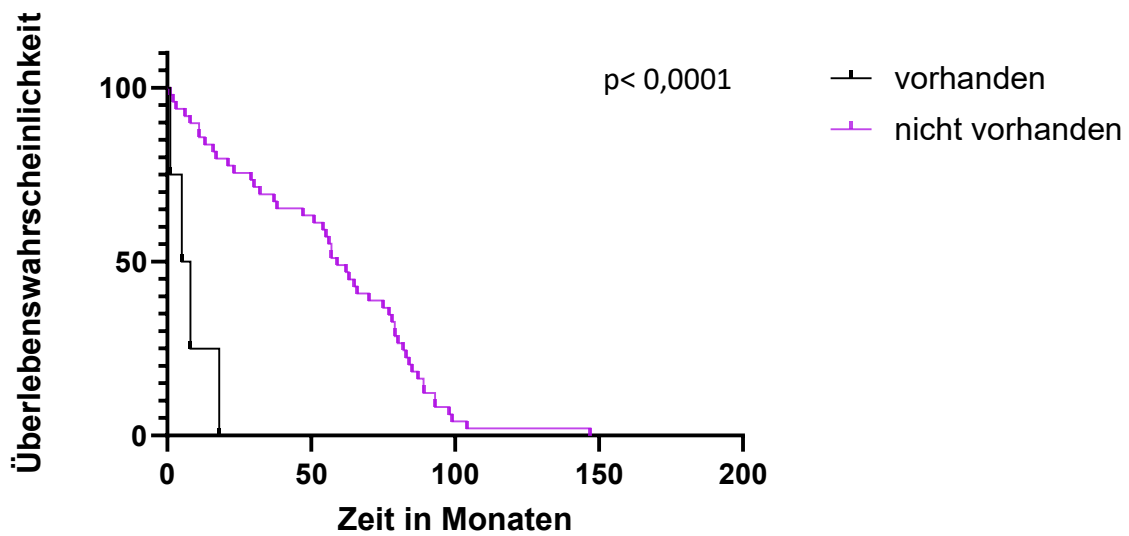


Abbildung 32: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums bei einer geringen VDR-Expression

In Bezug auf eine hohe Expression an VDR ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0180$ ). Der Median für den Nikotinkonsum von über 20py lag bei 60,5 Monaten, der Median von unter 20py bei 61 Monaten (Abb. 32).

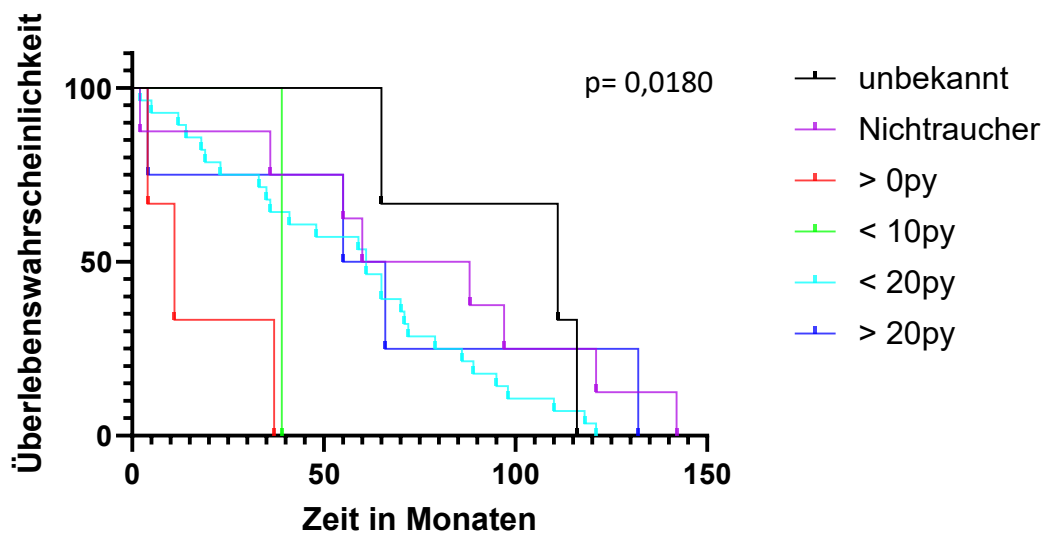


Abbildung 33: Overall Survival in Abhängigkeit des Nikotinabusus bei einer hohen VDR-Expression

Das Geschlecht der Patienten wies relevante Unterschiede in Zusammenhang mit einer hohen Expression an VDR auf ( $p= 0,0069$ ). Der Median für die Überlebenswahrscheinlichkeiten lag bei dem weiblichen Patientenkollektiv bei 98 Monaten und bei dem männlichen Patientenkollektiv bei 58,5 Monaten (Abb. 33).

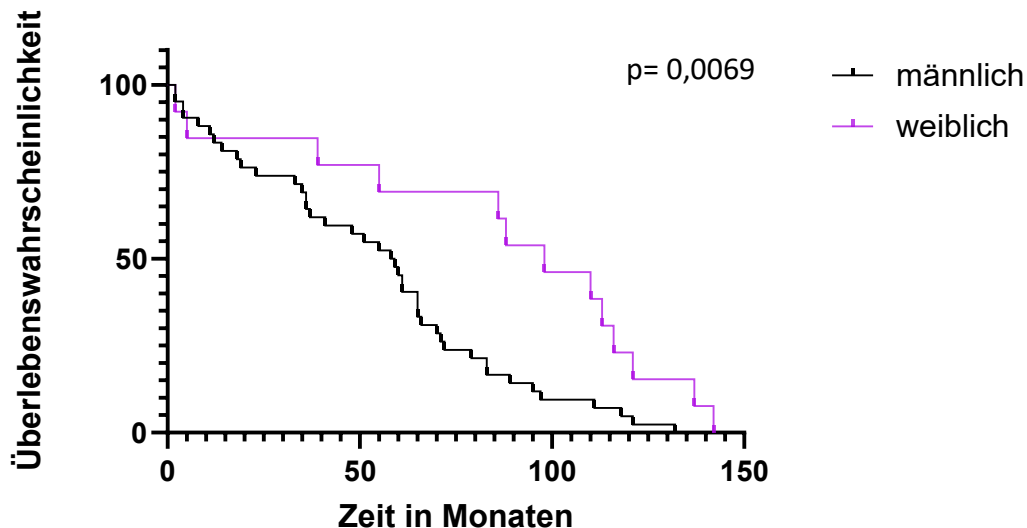


Abbildung 34: Overall Survival in Abhängigkeit des Geschlechts in Zusammenhang mit einer hohen VDR-Expression

Ebenso konnte mittels des Logrank-Tests ein signifikanter Unterschied in der Lokalisation und der Overall Survival bei einer hohen ( $p < 0,0001$ ) sowie geringen ( $p = 0,0014$ ) Expression an VDR festgestellt werden. In Bezug auf eine geringe Expression an VDR fand sich der geringste Median mit 9,5 Monaten bei der Epiglottis bzw. Vallecula (Abb. 34). Der größte Median fand sich bei dahingegen mit 68 Monaten bei der Tonsilla palatina. Bezüglich einer hohen Expression an VDR fand sich der geringste Median mit 2 Monaten ebenfalls bei der Epiglottis bzw. Vallecula (Abb. 35). Der höchste Median zeigte sich dahingegen bei dem Weichgaumen bzw. der Uvula mit 92 Monaten.

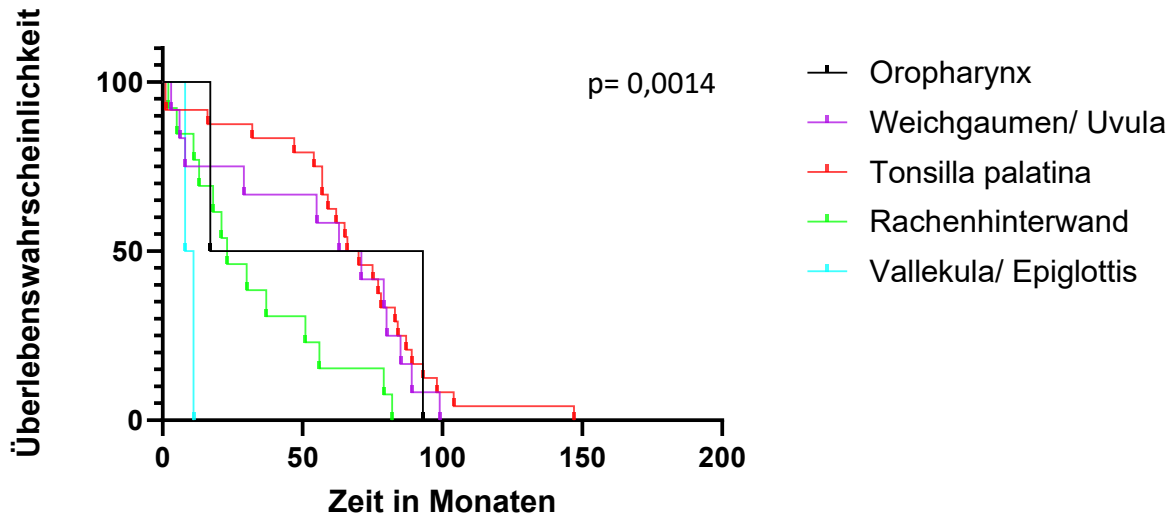


Abbildung 35: Overall Survival in Abhängigkeit von der Lokalisation und einer geringen Expression an VDR

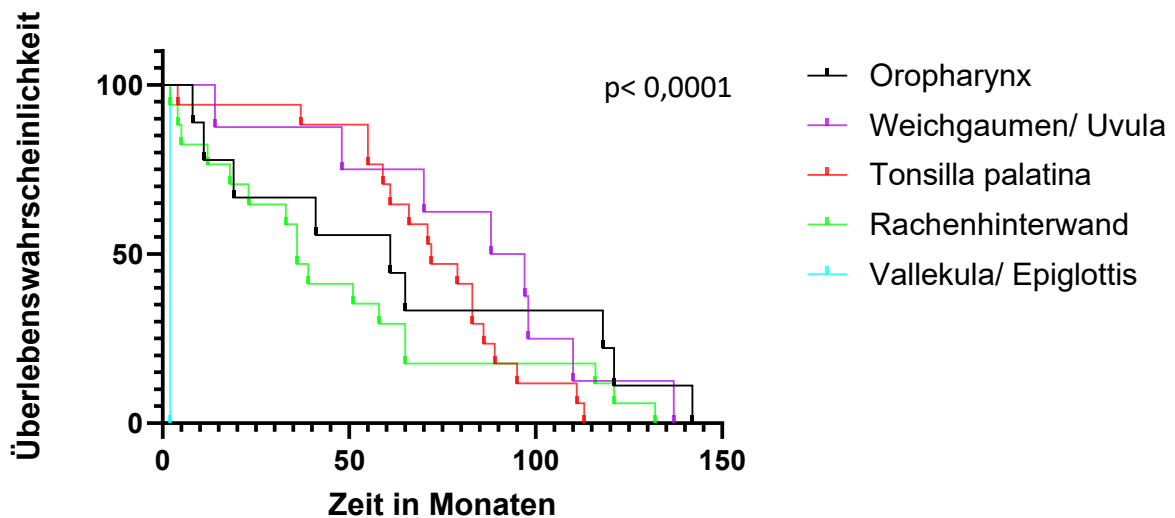


Abbildung 36: Overall Survival in Abhängigkeit der Lokalisation und einer hohen Expression an VDR

Mit einem p-Wert von 0,0268 konnte mit Hilfe des Logrank-Tests ein signifikanter Unterschied zwischen den Therapieoptionen und der erhöhten VDR-Expression festgestellt werden (Abb. 36). Für die OP wurde ein Median von 70, für die Induktionstherapie von 36 Monaten, für die Radiotherapie von 18 Monaten und für die RCT von 27,5 Monaten berechnet.

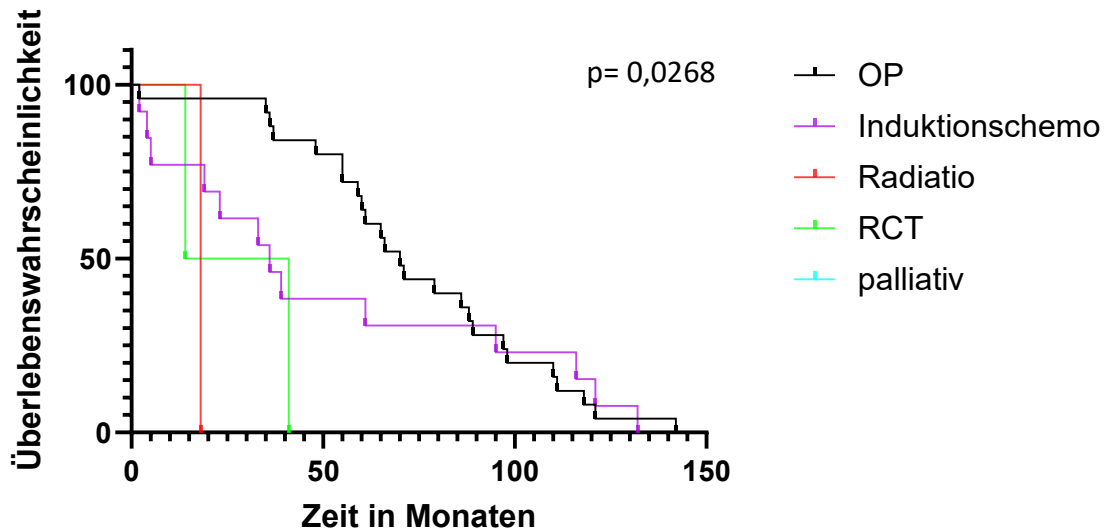


Abbildung 37: Overall Survival in Abhängigkeit der Therapieoptionen in Zusammenhang zu einer hohen VDR-Expression

#### 4.3.2 Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf Ki67

In Bezug auf eine geringe Expression an Ki67 hatten das T-, N- und M-Stadium, die Lokalisation sowie die Therapieoptionen eine statistische Relevanz. Eine hohe Expression an Ki67 korrelierte mit dem Geschlecht, der Lokalisation, dem Nikotinabusus, dem UICC-Stadium, den Therapieoptionen sowie dem T-, und N-Stadium.

Bei einer geringen Expression an Ki67 zeigte sich somit keine statistische Relevanz für das Grading, das UICC-Stadium, das Alter, das Geschlecht, das Vorkommen von Rezidiven sowie dem Nikotin- und Alkoholabusus. Dahingegen zeigt sich bei einer hohen Expression an VDR keine Korrelation mit dem Grading, dem Alter, dem N-Stadium, dem Vorhandensein von Rezidiven sowie dem Alkoholabusus.

Mittels des Logrank-Tests, welcher einen p-Wert von 0,0002 bei einer hohen Ki67-Expression ergab, konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten der UICC-Stadien festgestellt werden. Der geringste Median lag mit 6,5 Monaten bei dem Stadium IVC. Dahingegen lag der höchste Median mit 78,1 Monaten bei Stadium I (Abb. 37).

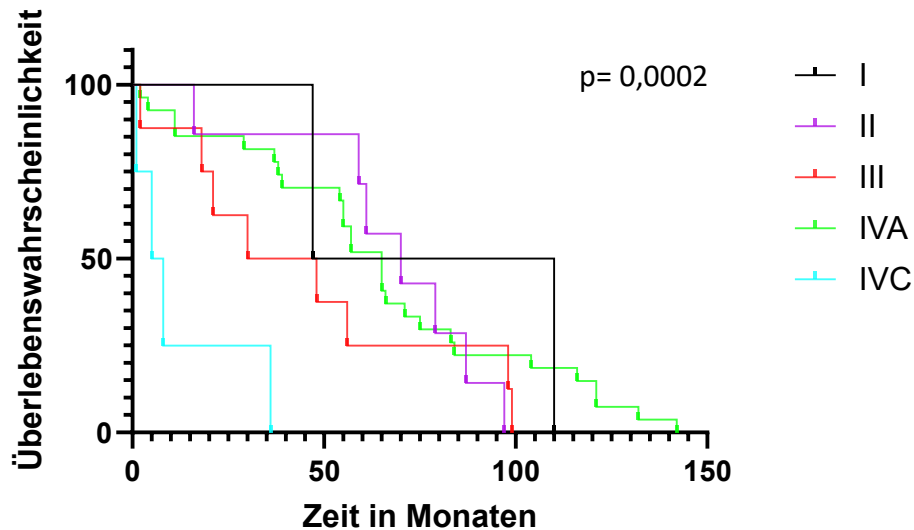


Abbildung 38: Overall Survival in Abhängigkeit des UICC-Stadiums und einer hohen Expression von Ki67

Bei den T-Stadien fand sich bei einer geringen ( $p= 0,0120$ ) und einer hohen ( $p= 0,0242$ ) Ki67 Expression ein signifikanter statistischer Unterschied. Der niedrigste Median bezüglich einer hohen Expression fand sich mit 48 Monaten bei Stadium 3, der höchste zeigte sich mit 75 Monaten bei Stadium 1 (Abb. 39). In Bezug auf eine niedrige Expression an Ki67 fand sich der größte Median ebenso bei einem Stadium von 1 mit 82 Monaten, der niedrigste Median fand sich bei dem Stadium 4a mit 13 Monaten (Abb. 38).

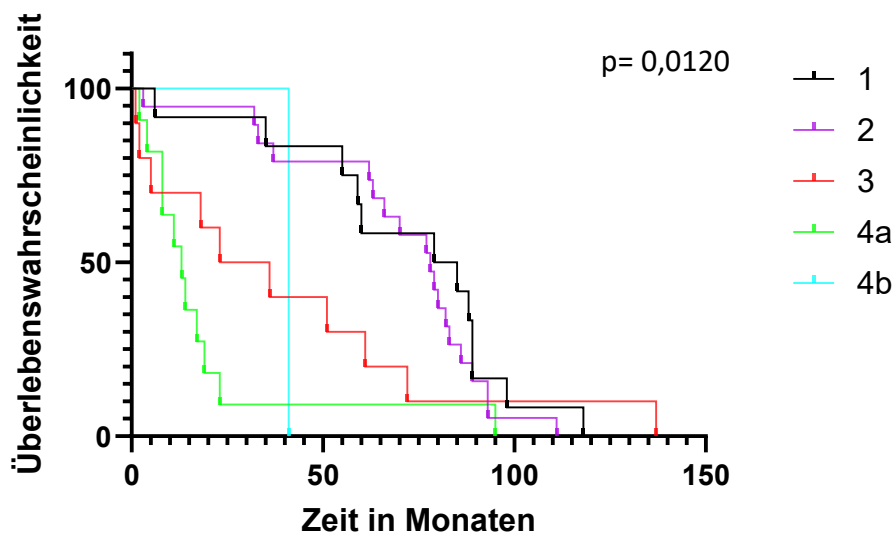


Abbildung 39: Overall Survival in Abhängigkeit des T-Stadiums in Zusammenhang mit einer geringen Ki67-Expression

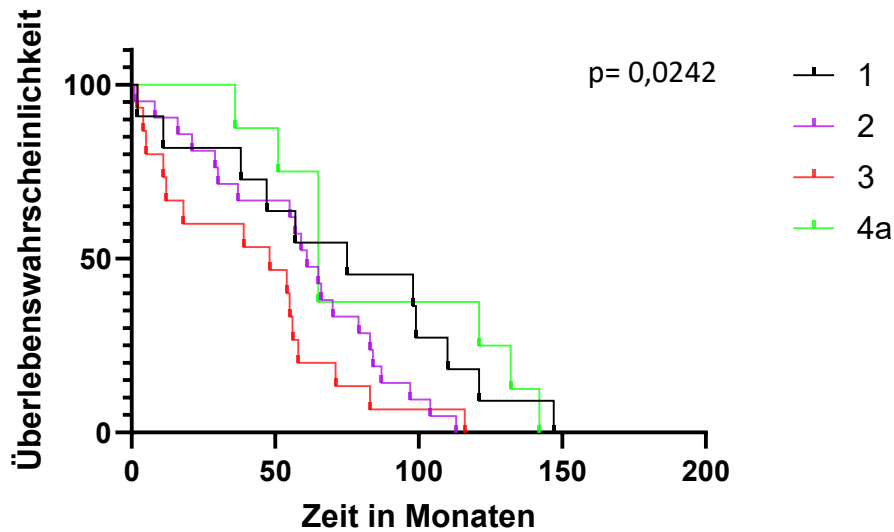


Abbildung 40: Overall Survival in Zusammenhang mit einer hohen Ki67-Expression

Bezüglich der N-Stadien ergab sich ein signifikanter Unterschied bei einer geringen Expression an Ki67 ( $p = 0,0080$ ). Der geringste Median fand sich mit 11 Monaten bei dem Stadium 2a, dahingegen zeigten die Stadien 0 und 1 den größten Median mit jeweils 79 Monaten (Abb. 40).

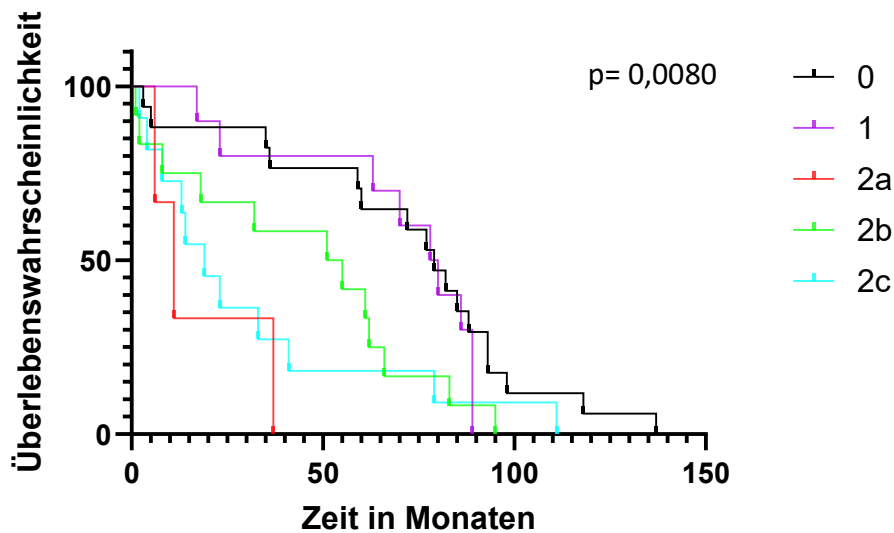


Abbildung 41: Overall Survival in Zusammenhang mit dem N-stadium und einer geringen Expression an Ki67

Sowohl für die niedrige ( $p= 0,0191$ ) Expression als auch die hohe ( $p< 0,0001$ ) Expression an Ki67 konnte eine Korrelation mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen festgestellt werden. Der Median für das Vorhandensein von Fernmetastasen bei einer geringen Expression an Ki67 lag bei 2 Monaten (Abb. 41). Der Median für das Vorhandensein von Fernmetastasen in Bezug auf eine hohe Expression von Ki67 lag bei 6,5 Monaten (Abb. 42).

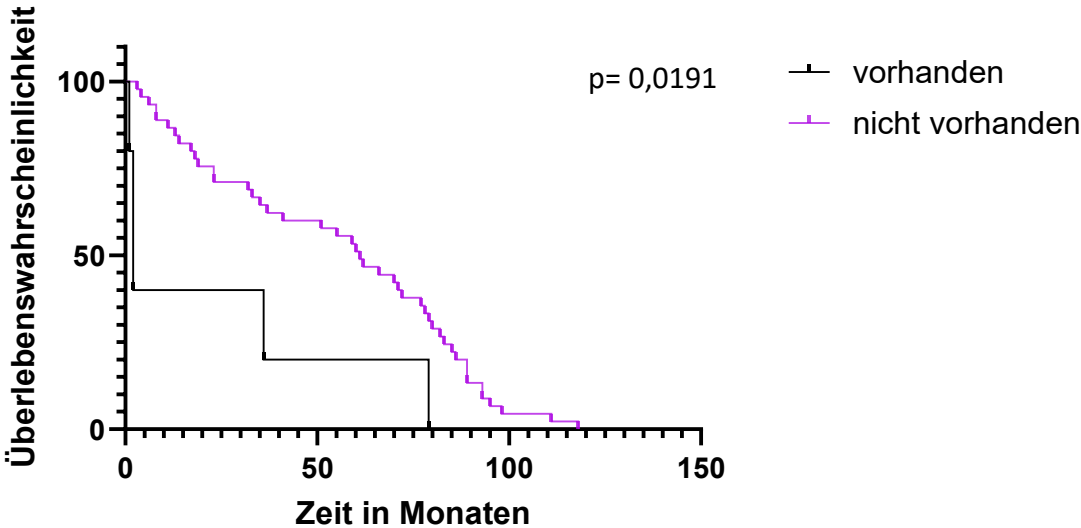


Abbildung 42: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums in Zusammenhang mit einer geringen Expression von Ki67

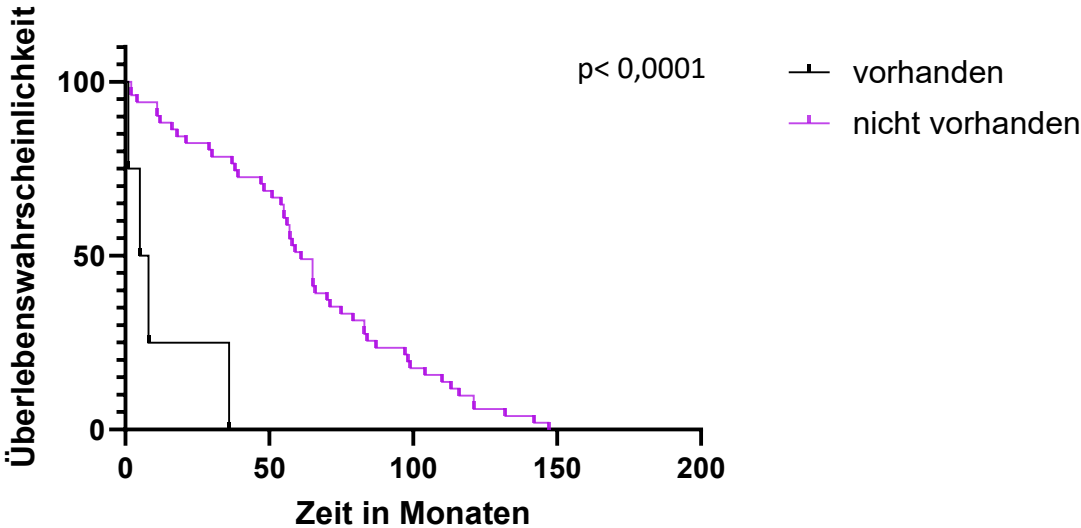


Abbildung 43: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums in Zusammenhang mit einer hohen Expression von Ki67

Auch die statistische Analyse des Genussmittels Nikotin ergab einen signifikanten Unterschied bei einer hohen Expression von Ki67 ( $p= 0,0485$ ). Der geringste Median fand sich bei Patienten, die unter 5py rauchten (20,5 Monate). Der größte Median zeigte sich bei Patienten, welche Nichtraucher waren (76 Monate), (Abb. 43).

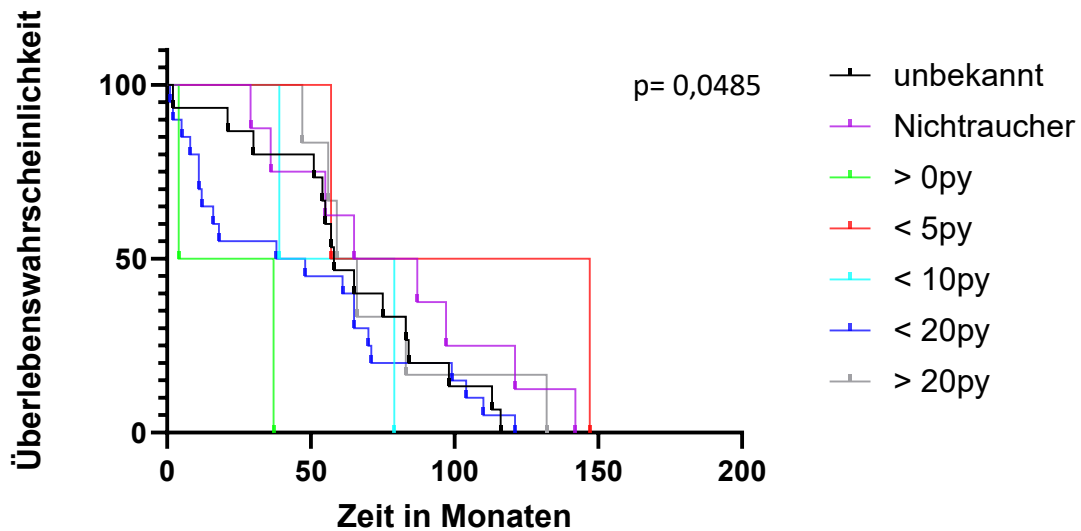


Abbildung 44: Overall Survival in Abhängigkeit des Nikotinkonsums und einer hohen Expression von Ki67

Das Geschlecht wies mit einem p-Wert von 0,0022 eine statistische Signifikanz in Bezug auf eine hohe Expression von Ki67 auf. Der Median des weiblichen Patientenkollektivs lag bei 94 Monaten. Bei dem männlichen Patientenkollektiv ergab sich ein Median von 55 Monaten (Abb. 44).

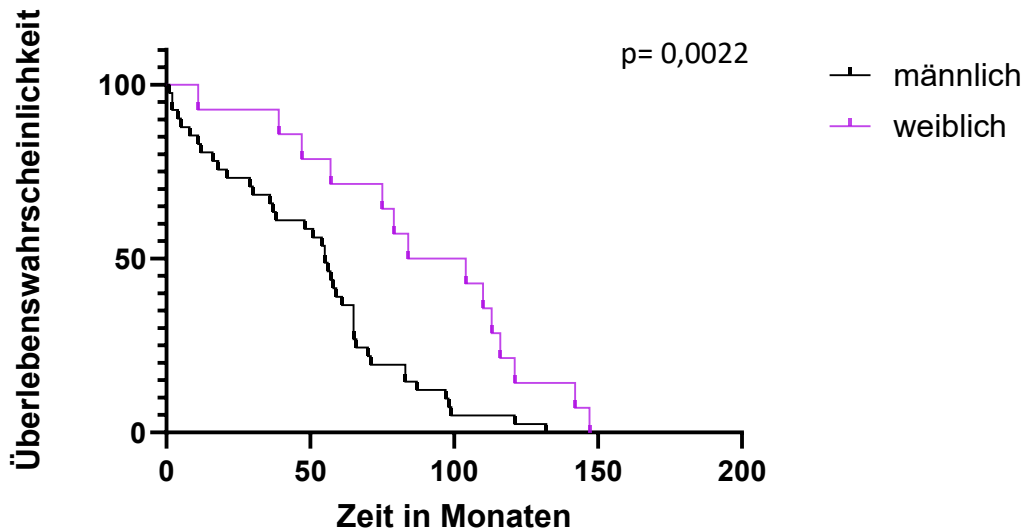


Abbildung 45: Overall Survival in Abhängigkeit des Geschlechts in Zusammenhang mit einer hohen Expression von Ki67

Mittels des Logrank-Tests konnte ein signifikanter Unterschied in der Lokalisation sowohl bei einer geringen ( $p < 0,0001$ ) als auch bei einer hohen ( $p = 0,0002$ ) Expression an Ki67 festgestellt werden. Lag eine geringe Expression an Ki67 vor (Abb. 45), so lag der niedrigste Median bei 2 Monaten (Vallekula/Epiglottis) und der höchste Median bei 77 Monaten (Tonsilla palatina). In Bezug auf eine hohe Ki67 Expression fand sich der geringste Median mit 9,5 Monaten bei der Vallekula bzw. Epiglottis. Der höchste Median lag hier jedoch mit 121 Monaten bei dem Oropharynx (Abb. 46).

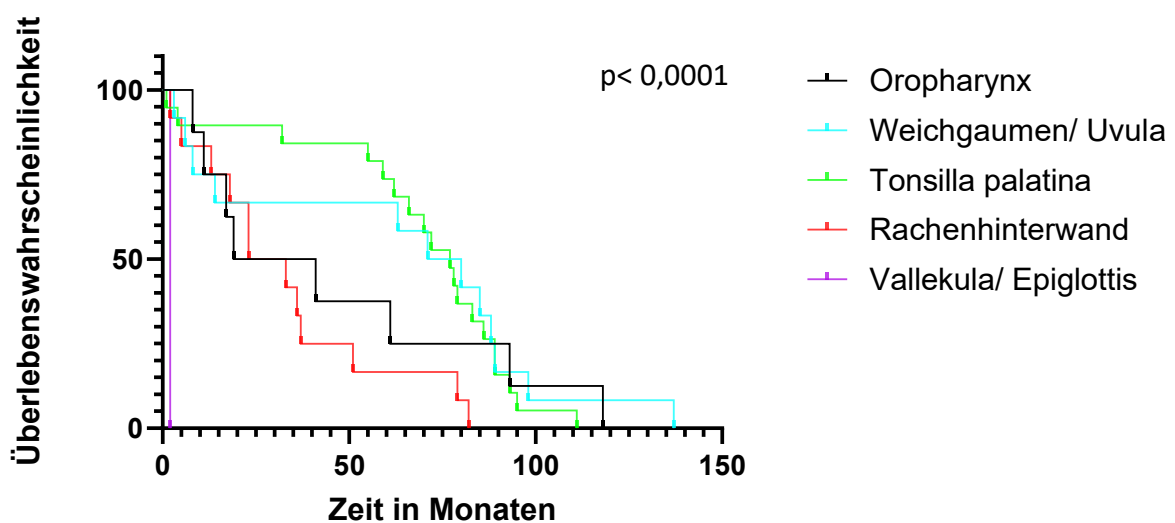


Abbildung 46: Overall Survival in Abhängigkeit der Lokalisation in Zusammenhang mit einer niedrigen Expression von Ki67

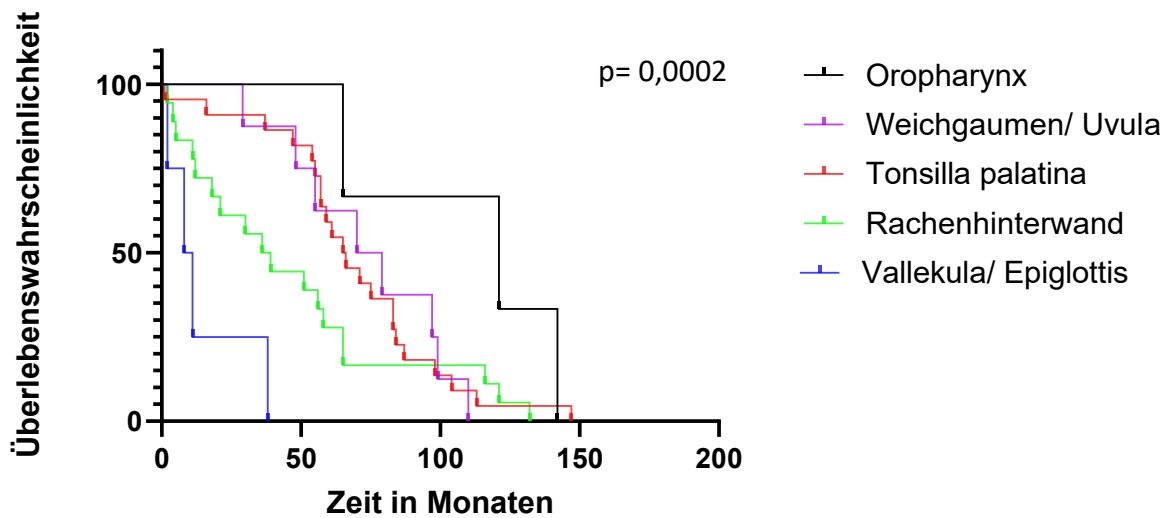


Abbildung 47: Overall Survival in Abhängigkeit der Lokalisation in Zusammenhang mit einer hohen Ki67 Expression

Mit einem p-Wert von 0,0204 konnte mit Hilfe des Logrank-Tests ein signifikanter Unterschied zwischen den Therapieoptionen in Bezug auf einer hohen Expression an Ki67 festgestellt werden. Für die OP wurde ein Median von 59, für die Induktionschemotherapie von 116, für die RCT von 21 und für die Radiatio von 18 Monaten berechnet (Abb. 47).

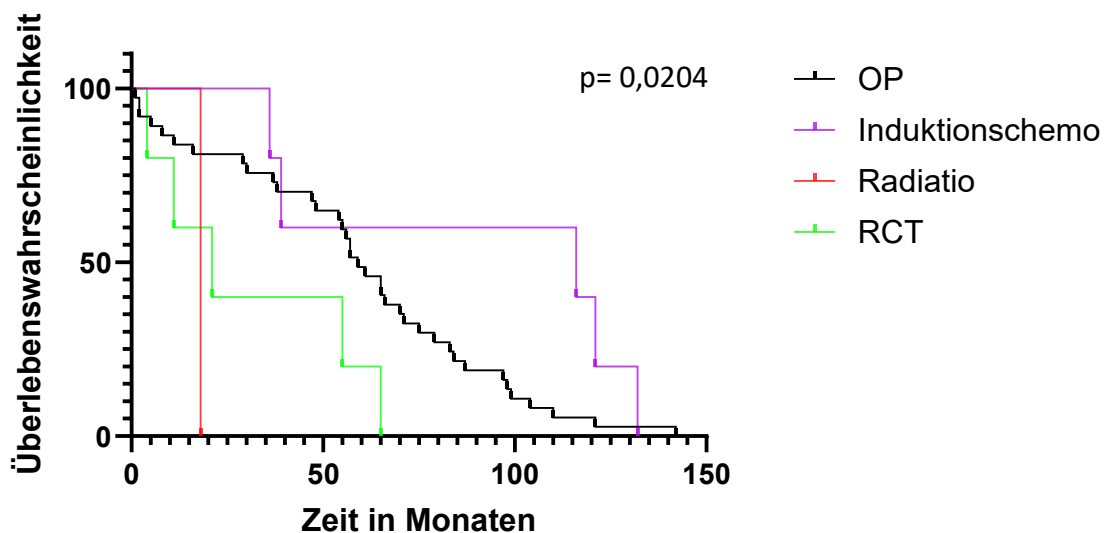


Abbildung 48: Overall Survival in Abhängigkeit der Therapieoptionen in Zusammenhang mit einer hohen Expression an Ki67

### 4.3.3 Überlebenswahrscheinlichkeiten in Bezug auf Taspase1

In Bezug auf eine geringe Expression an Taspase1 zeigten das Grading, das UICC-Stadium sowie das M-Stadium eine statistische Relevanz. Eine hohe Expression an Taspase1 korrelierte mit dem Geschlecht und dem M-Stadium.

Somit hatten das N-Stadium, der HPV-Status, der Alkohol- und Nikotinkonsum, das Alter, das Vorhandensein von Rezidiven, die Lokalisation, die Therapieoptionen und das T Stadium keine statistische Relevanz.

Mit einem p-Wert von 0,0446 ergab sich durch das Grading ein Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf einen geringen H-Score der Taspase1. Der geringste Median fand sich mit 55 Monaten bei einem Grading von 3, dahingegen fand sich der größte Median bei einem Grading von 1 mit 89 Monaten (Abb. 48).

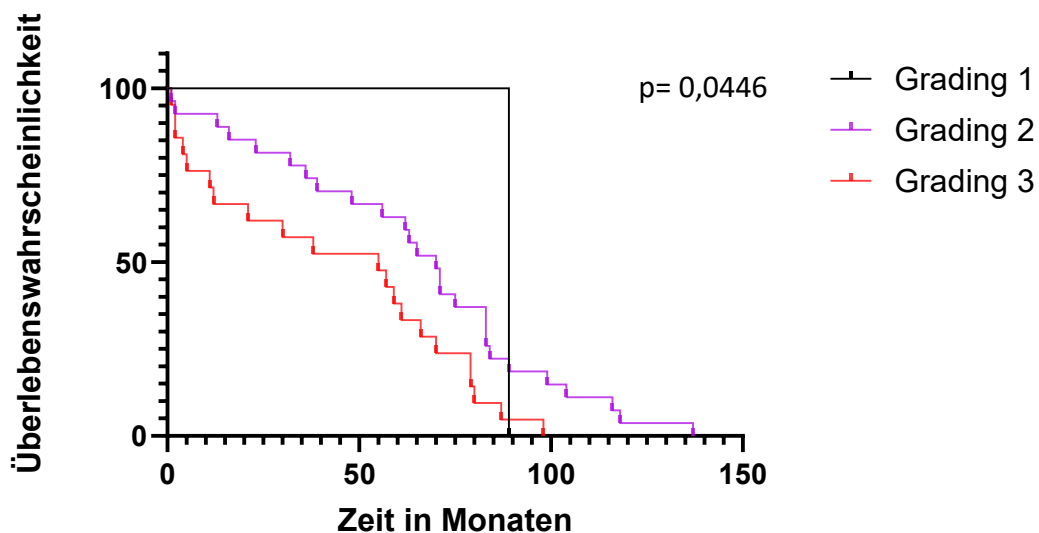


Abbildung 49: Overall Survival in Abhängigkeit von dem Grading und einer geringen Taspase1-Expression

Mittels des Logrank-Tests, welcher einen p-Wert von 0,0430 bei einer geringen Expression an Taspase1 ergab, konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten der UICC-Stadien festgestellt werden. Bei einem UICC-Stadium von I ließ sich mit 118 Monaten der höchste Median feststellen. Der geringste Median (18,5 Monate) fand sich bei dem Stadium IVC (Abb. 49).

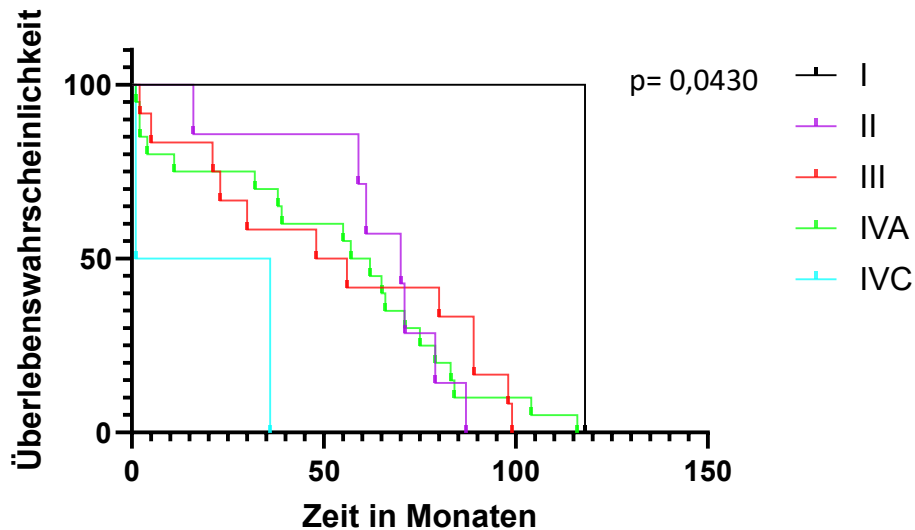


Abbildung 50: Overall Survival in Abhängigkeit des UICC-Stadiums bei einer geringen Taspase1-Expression

Sowohl für eine geringe Expression ( $p= 0,0164$ ) als auch eine hohe Expression ( $p= 0,0096$ ) von Taspase1 konnte eine statistische Relevanz bezüglich des M-Stadiums festgestellt werden. Der Median für das Vorhandensein von Fernmetastasen in Bezug auf eine geringe Expression an Taspase1 lag bei 18,5 Monaten (Abb. 50). Der Median für das Vorhandensein von Fernmetastasen bei einer hohen Expression von Taspase1 lag bei 14,5 Monaten, der Median für das Fehlen von Fernmetastasen lag bei 60 Monaten (Abb. 51).

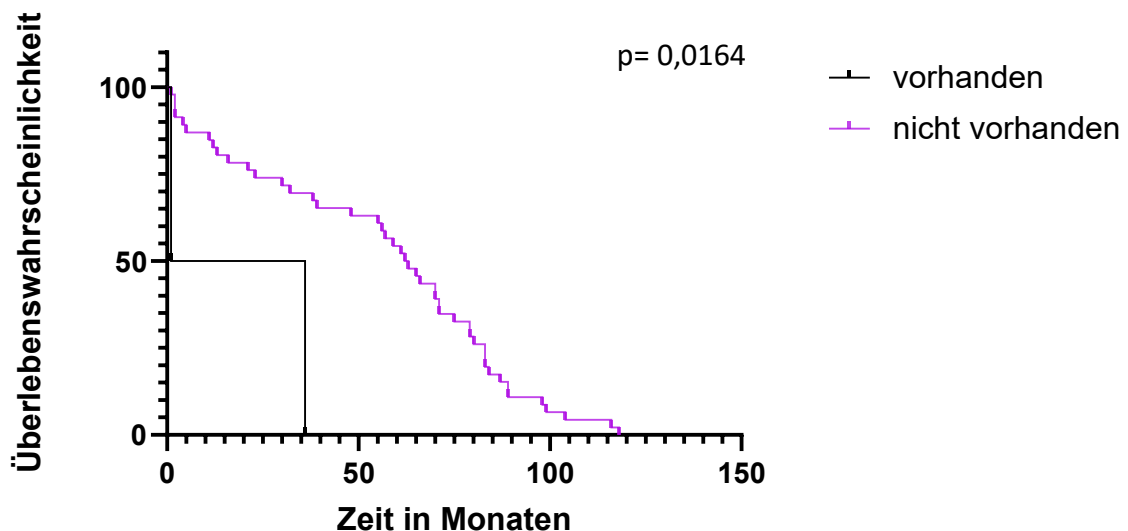


Abbildung 51: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums in Bezug auf eine geringe Taspase1-Expression

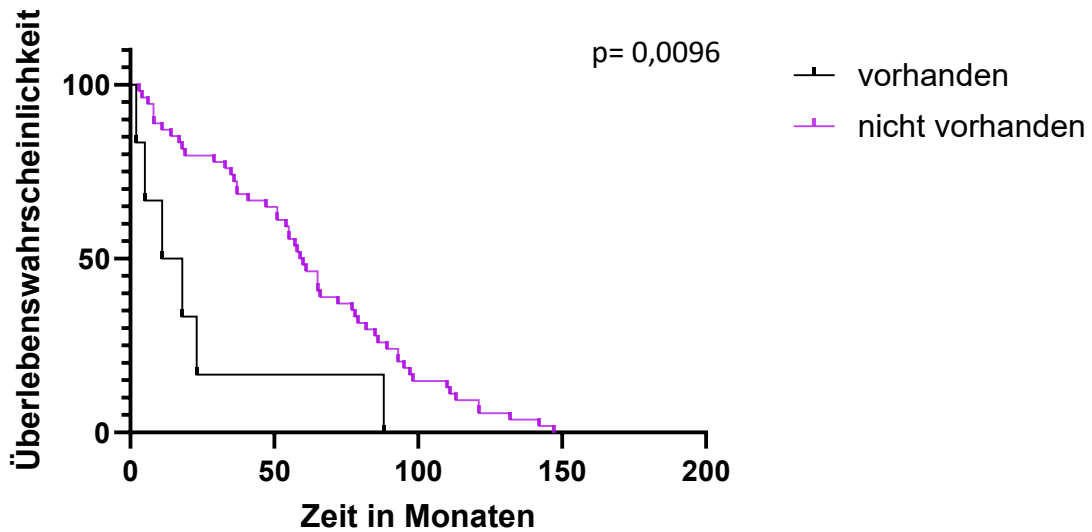


Abbildung 52: Overall Survival in Abhängigkeit des M-Stadiums in Bezug zu einer hohen Taspase1-Expression

Das Geschlecht der Patienten wies relevante Unterschiede in Bezug auf eine hohe Expression an Taspase1 auf ( $p= 0,0137$ ). Der Median für das weibliche Patientenkollektiv lag bei 33 Monaten, für das männlich Kollektiv lag er dahingegen bei 60 Monaten (Abb. 52).

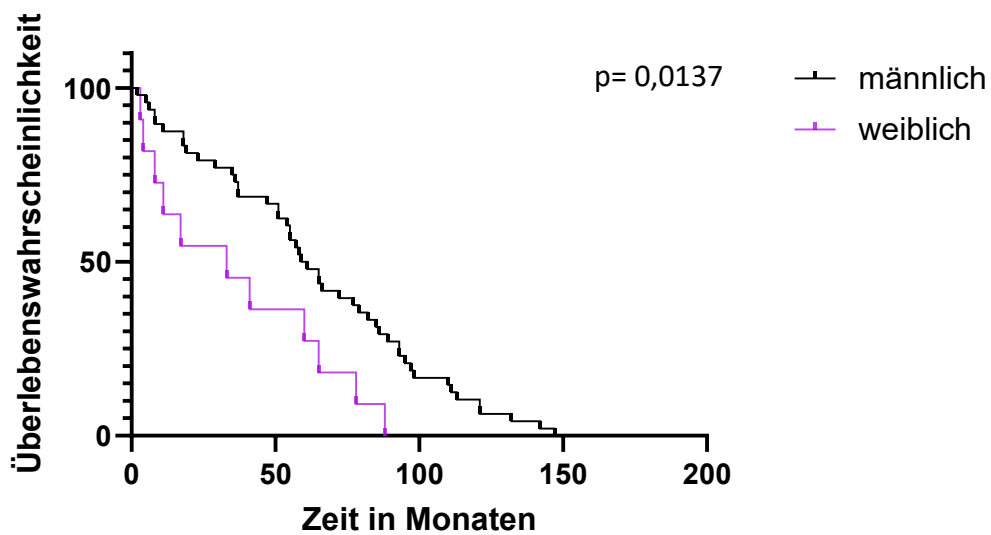


Abbildung 53: Overall Survival in Abhängigkeit des Geschlechts in Zusammenhang mit einer hohen Taspase1-Expression

## 4.4 Krankheitsfreies Überleben

### 4.4.1 Krankheitsfreies Überleben in Bezug auf VDR

Das T- und das N- Stadium sowie der Alkoholkonsum beeinflussten bei einer geringen Expression die DFS. Bei einer hohen Expression zeigte sich in Bezug auf die DFS eine Korrelation mit dem Nikotinabusus, sowie dem T-, N- und M-Stadium.

Somit hatten das Grading, das UICC-Stadium, der HPV-Status, das Alter, das Geschlecht, die Lokalisation und die Therapieoptionen keinen Einfluss auf ein krankheitsfreies Überleben.

Bei den T-Stadien fand sich ein signifikanter statistischer Unterschied bezüglich einer geringen ( $p= 0,0367$ ) sowie hohen ( $p= 0,0328$ ) Expression an VDR. Die geringste DFS bei einer niedrigen Expression von VDR, mit einem Median von 3,5 Monaten, fand sich bei einem T-Stadium von 1 (Abb. 53). Die größte DFS in Bezug auf eine geringe Expression von VDR fand sich mit 21 Monaten bei einem Stadium von 2. Bei einer hohen Expression an VDR (Abb. 54) fand sich der größte Median bei Stadium 3 (42 Monate) und der geringste bei Stadium 2 (4 Monate).

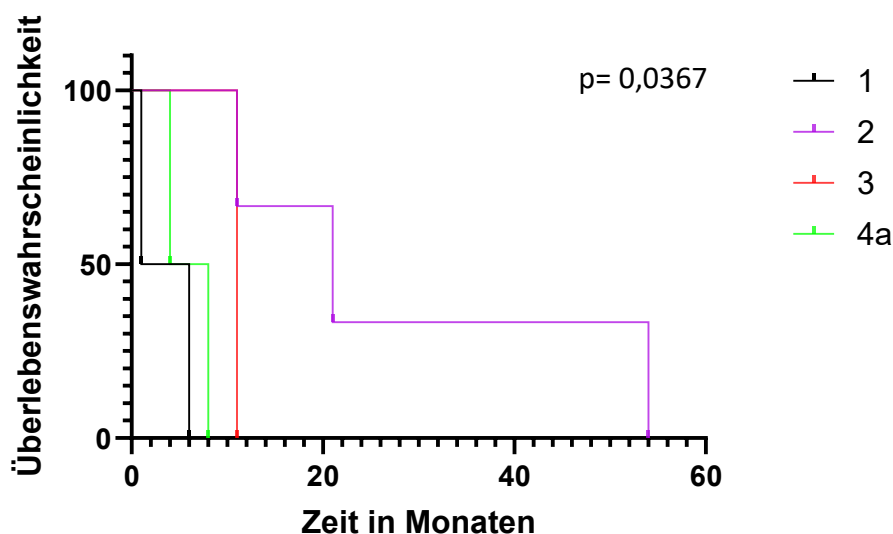


Abbildung 54: DFS in Abhängigkeit des T-Stadiums in Zusammenhang mit einer geringen Expression von VDR

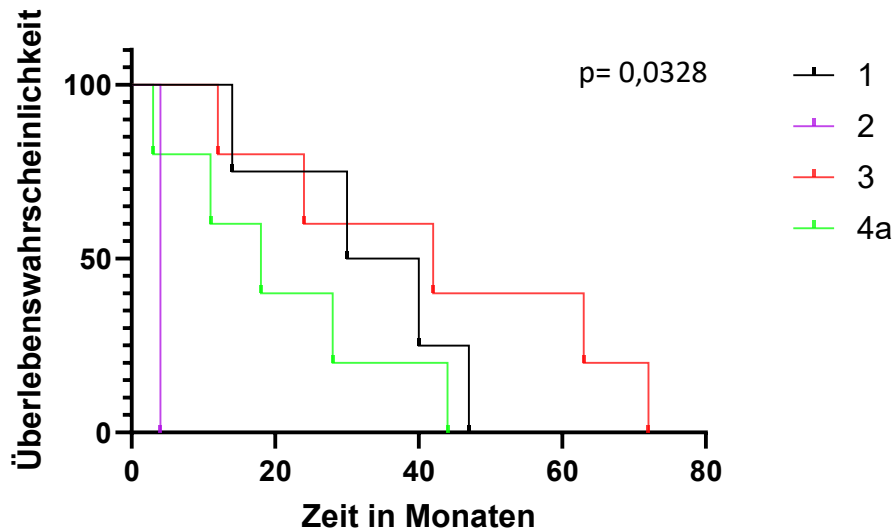


Abbildung 55: DFS in Abhängigkeit des T-Stadiums und einer hohen Expression von VDR

Bezüglich der N-Stadien und einer geringen ( $p= 0,0374$ ) sowie hohen ( $p= 0,0484$ ) Expression an VDR ergab sich ein signifikanter Unterschied in der DFS. Der niedrigste Median in Bezug auf eine geringe Expression an VDR fand sich mit einem Monat bei dem Stadium 2a (Abb. 55). Dahingegen fand sich der größte Median bei einem N-Stadium von 1 (31 Monate). Bei einer hohen Expression von VDR zeigte sich der niedrigste Median mit 8 Monaten bei dem Stadium 2a, der größte Median fand sich mit 41 Monaten bei Stadium 0 (Abb. 56).

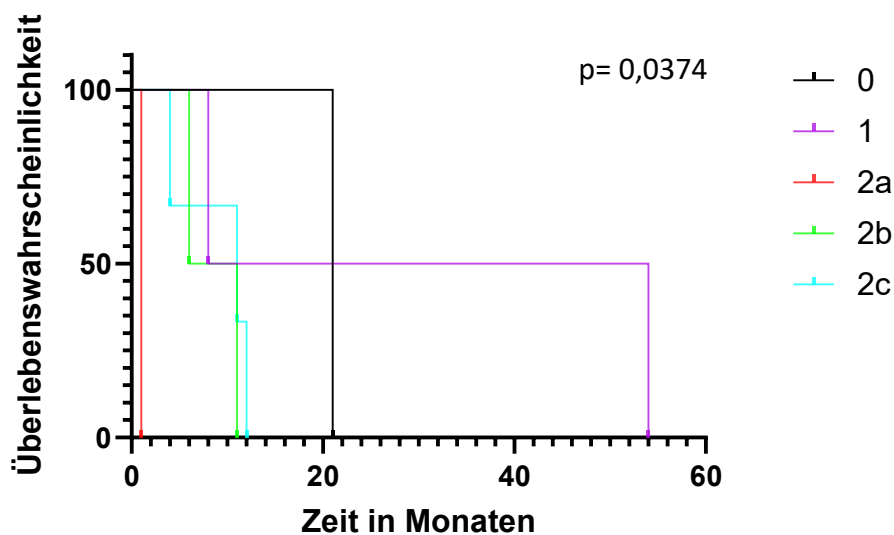


Abbildung 56: DFS in Abhängigkeit des N-Stadiums in Zusammenhang mit einer geringen Expression von VDR

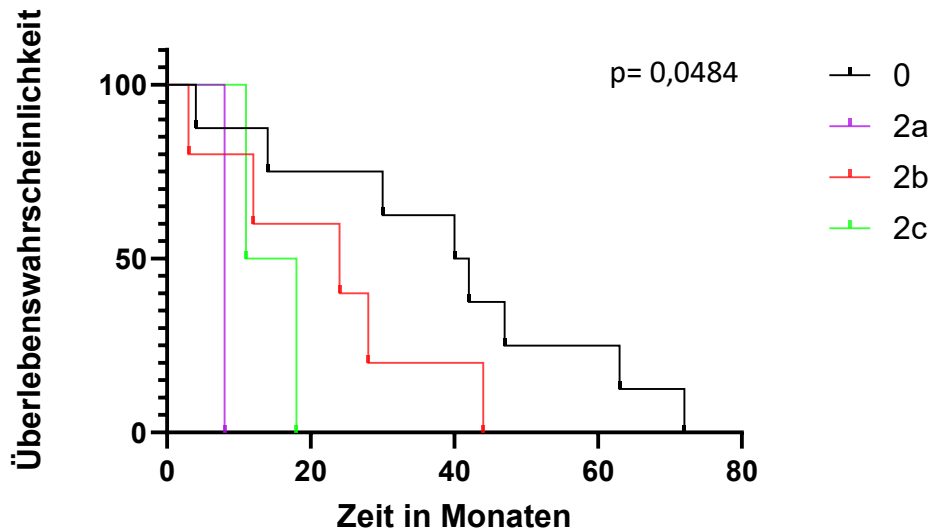


Abbildung 57: DFS in Abhängigkeit des N-Stadiums in Zusammenhang mit einer hohen Expression von VDR

Mit einem p-Wert von 0,0186 konnte für die DFS in Relation zu dem Vorkommen von Fernmetastasen und einer hohen Expression an VDR ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Median für das Vorhandensein von Fernmetastasen lag bei 9,5 Monaten (Abb. 57).

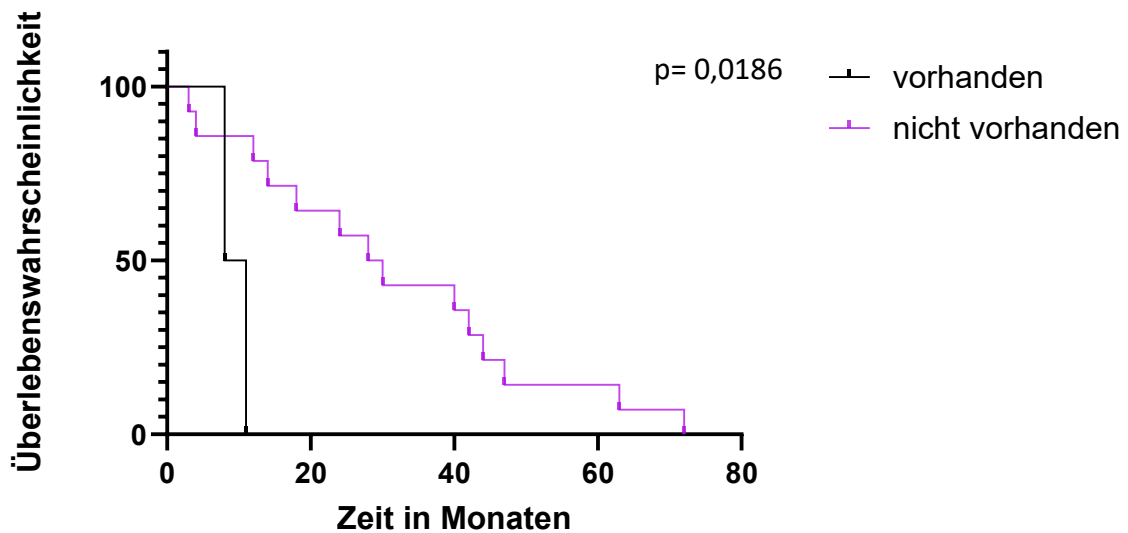


Abbildung 58: DFS in Abhängigkeit des M-Stadiums in Zusammenhang mit einer hohen Expression an VDR

In Bezug zu Alkoholkonsum konnte mittels des Logrank-Tests ein signifikanter Unterschied bei einer geringen Expression von VDR festgestellt werden ( $p= 0,0190$ ). Der niedrigste Median

zeigte sich bei einem mäßigen Alkoholkonsum (2,5 Monate). Der größte Median lag mit 16 Monaten bei Patienten, die keinen Alkohol zu sich nahmen (Abb. 58).

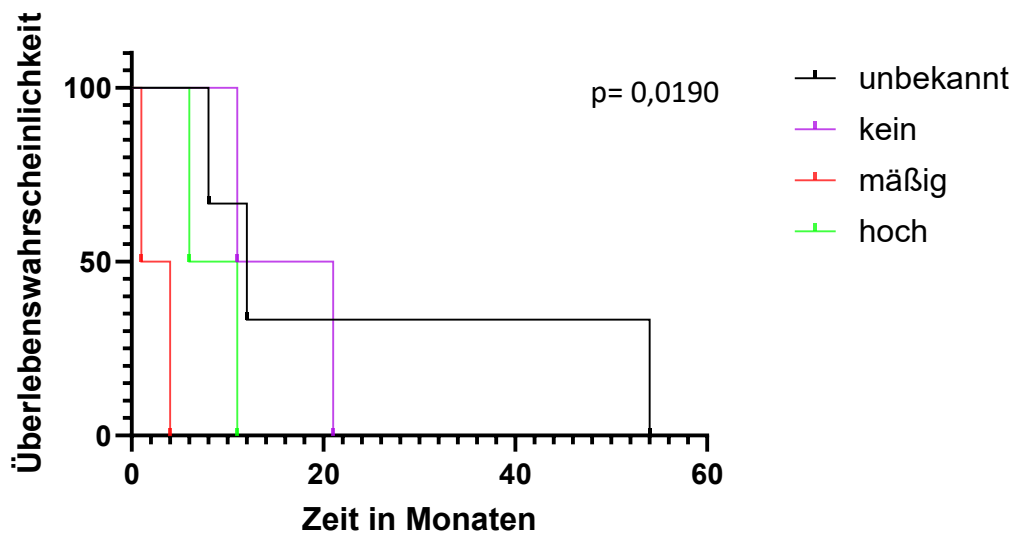


Abbildung 59: DFS in Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum und einer geringen Expression von VDR

Die statistische Analyse des Genussmittels Nikotin ergab einen signifikanten Unterschied bezüglich einer hohen Expression von VDR ( $p < 0,0001$ ). Die geringste Überlebenswahrscheinlichkeit lag mit 2 Monaten bei Patienten, die über 20py aufwiesen. Der höchste Median zeigte sich bei Patienten mit unter 20py (35 Monate), (Abb. 59).

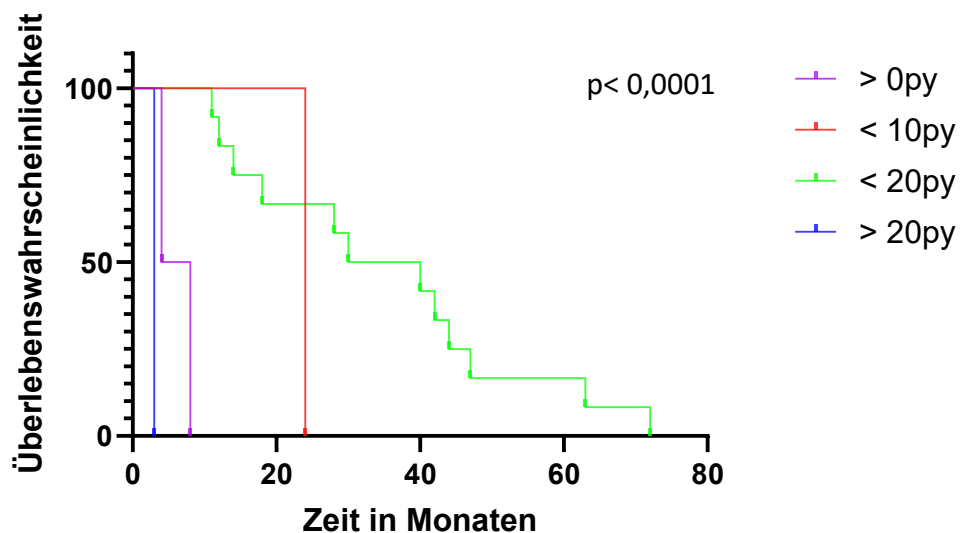


Abbildung 60: DFS in Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum und einer hohen Expression von VDR

#### 4.4.2 Krankheitsfreies Überleben in Bezug auf Ki67

Das N-Stadium und der Nikotinkonsum beeinflussten bei einer geringen Expression das krankheitsfreie Überleben. Der Alkohol- und Nikotinkonsum zeigten in Hinblick auf die DFS und einer hohen Expression von Ki67 eine Korrelation.

Somit hatten das Grading, das T-Stadium, das UICC-Stadium, das M-Stadium, der HPV-Status, das Geschlecht, das Alter, die Lokalisation und die Therapieoptionen keinen Einfluss auf die DFS.

Bezüglich der N-Stadien und einer niedrigen Expression von Ki67 ergab sich ein signifikanter Unterschied in der DFS ( $p=0,0069$ ). Der niedrigste Median (4,5 Monate) fand sich bei einem N-Stadium von 2a. Im Vergleich hierzu lag der höchste Median (40 Monate) bei einem N-Stadium von 0 vor (Abb. 60).

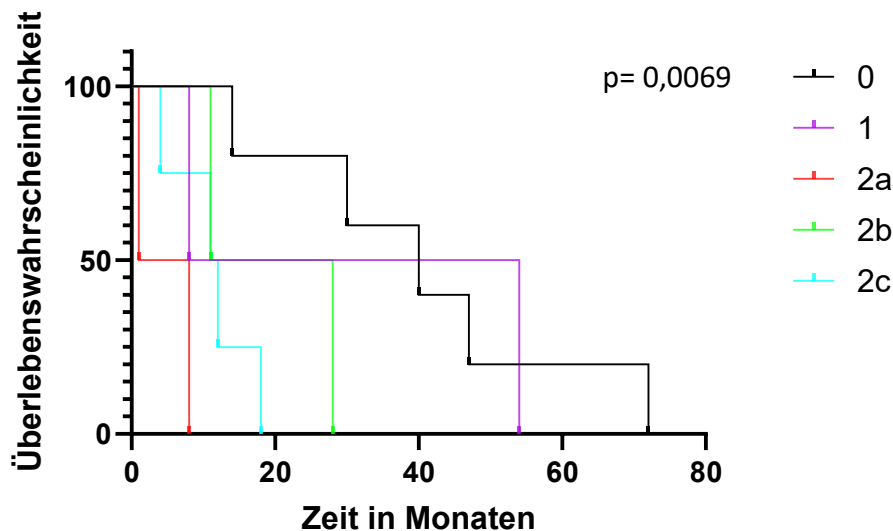


Abbildung 61: DFS in Zusammenhang mit dem N-Stadium und einer geringen Expression von Ki67

In Bezug zu Alkoholkonsum konnte mittels des Logrank-Tests ein signifikanter Unterschied in Bezug zu einer hohen Expression von Ki67 festgestellt werden ( $p=0,0300$ ). Der geringste Median lag mit 6 Monaten bei einem hohen Alkoholkonsum (Abb. 61). Dahingegen zeigte sich der größte Median bei einem unbekanntem Alkoholkonsum (44 Monate).

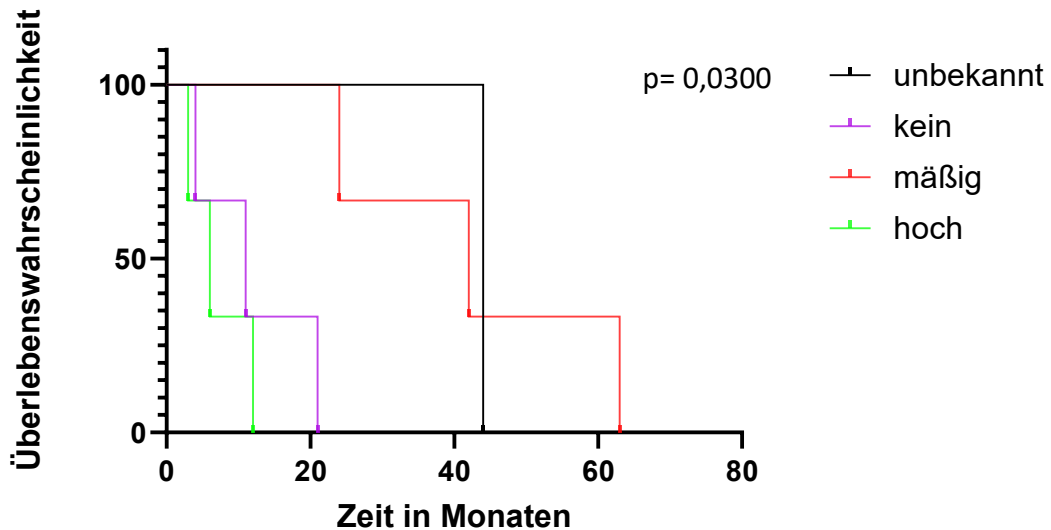


Abbildung 62: DFS in Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum und einer hohen Expression von Ki67

Auch die statistische Analyse des Genussmittels Nikotin ergab sowohl für eine geringe ( $p=0,0370$ ) als auch für eine hohe ( $p=0,0410$ ) Expression an Ki67 einen signifikanten Unterschied. Bei einer geringen Expression an Ki67 zeigte sich der niedrigste Median mit 4 Monaten bei unter 20py und der größte Median bei über 20py (28 Monate), (Abb. 62). In Bezug auf eine hohe Expression an Ki67 zeigte sich der geringste Median mit 4 Monaten bei unter 5py, wohingegen der größte Median bei Patienten, die über 20py aufwiesen, bei 27 Monaten lag (Abb. 63).

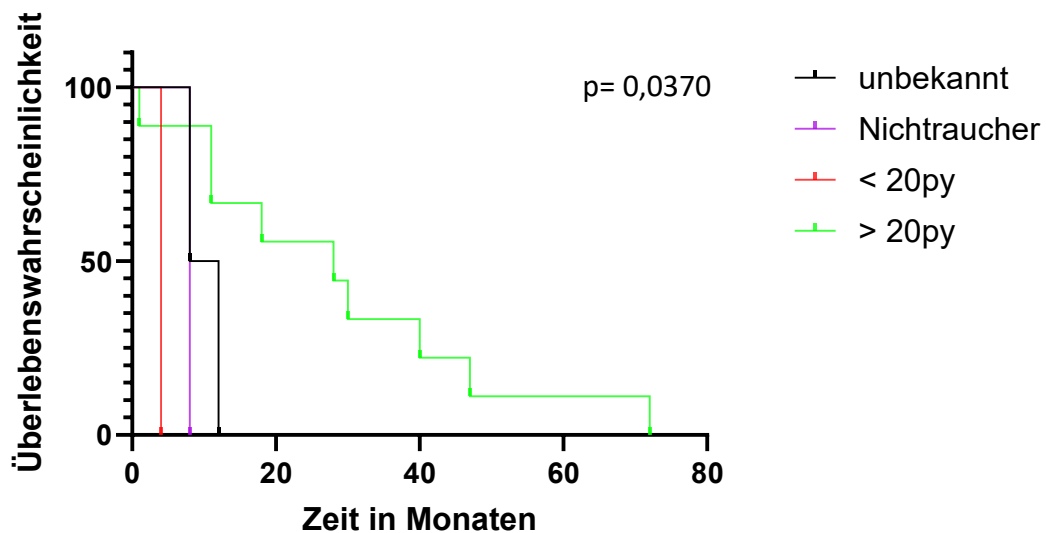


Abbildung 63: DFS in Zusammenhang mit dem Nikotinkonsum und einer geringen Expression von Ki67

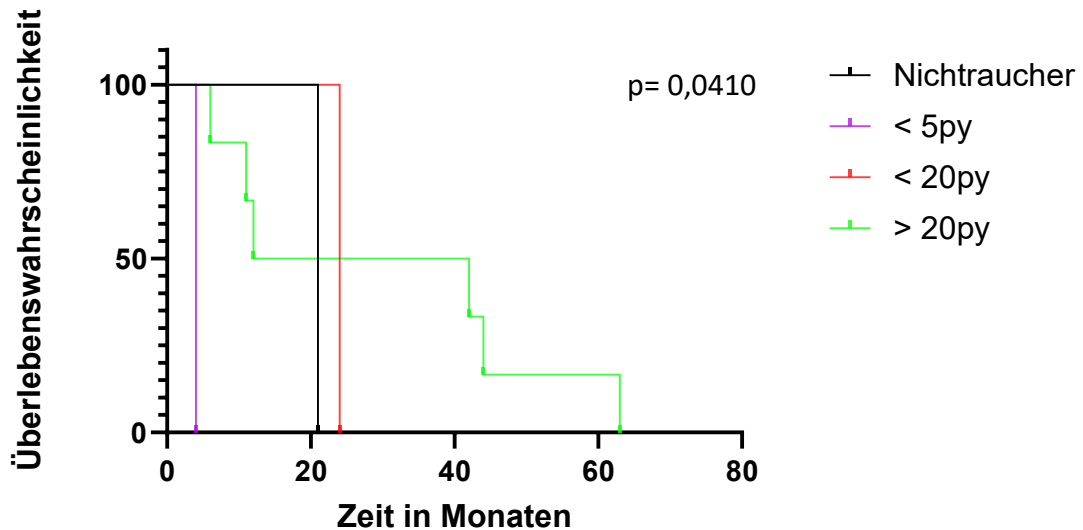


Abbildung 64: DFS in Zusammenhang mit dem Nikotinkonsum und einer hohen Expression von Ki67

#### 4.4.3 Krankheitsfreies Überleben in Bezug auf Taspase1

Bei einer geringen Expression von Taspase1 zeigte sich hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens eine Korrelation mit der Lokalisation. In Bezug auf eine hohe Expression an Taspase1 ergab sich eine statistische Signifikanz mit dem Nikotinkonsum und dem N-Stadium.

Keine statistische Relevanz hatten somit der Alkoholkonsum, das T- und M-Stadium, das UICC-Stadium, das Alter, das Grading, der HPV-Status, das Geschlecht und die Therapieoptionen.

Bezüglich der N-Stadien konnte hinsichtlich einer hohen Expression von Taspase1 eine statistische Relevanz erfasst werden ( $p= 0,0359$ ). Der höchste Median lag mit 43,5 Monaten bei Stadium 0, der geringste Median lag mit 4,5 Monaten bei Stadium 2a (Abb. 64).

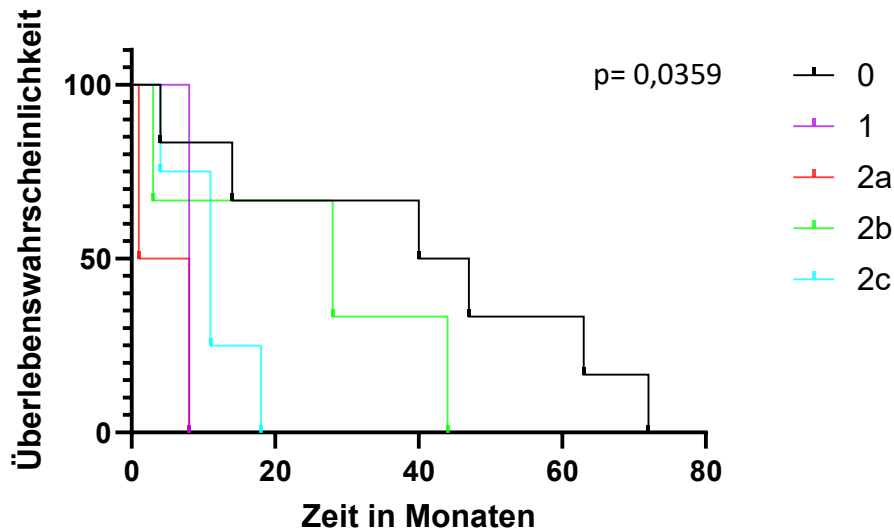


Abbildung 65: DFS in Zusammenhang mit dem N-Stadium und einer hohen Expression an Taspase1

Auch die statistische Analyse des Genussmittels Nikotin ergab einen signifikanten Unterschied in Bezug zu einer hohen Expression von Taspase1 ( $p=0,0055$ ). Der größte Median lag mit 28 Monaten bei Patienten, die unter 20py aufwiesen. Patienten, die über 20py geraucht hatten, waren mit dem geringsten Median assoziiert (3 Monate), (Abb. 65).

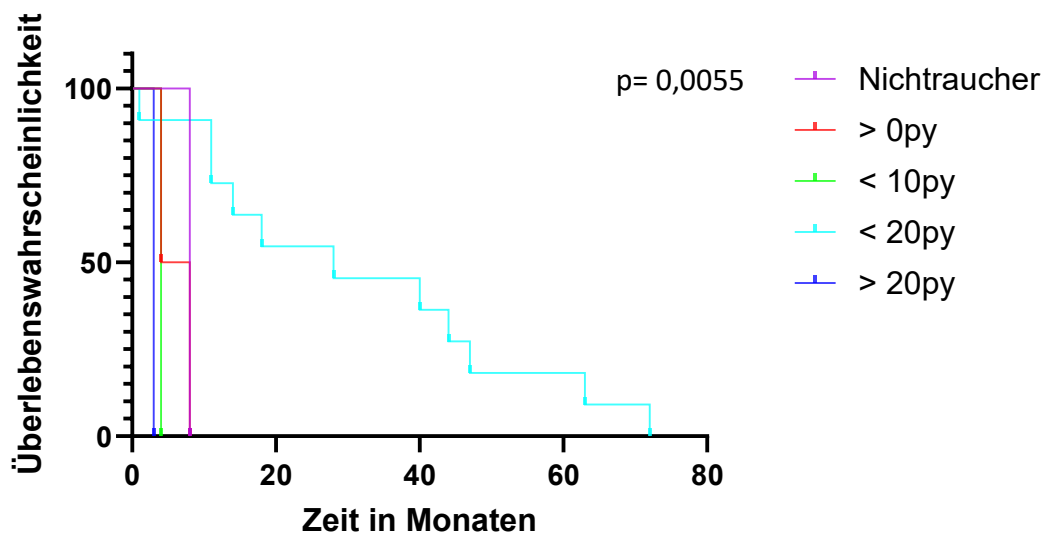


Abbildung 66: DFS in Zusammenhang mit dem Nikotinkonsum und einer hohen Expression von Taspase1

Mittels des Logrank-Tests konnte ein signifikanter Unterschied in der Lokalisation und der DFS in Bezug auf die verringerte Taspase1 Expression festgestellt werden ( $p=0,0030$ ). Der

geringste Median fand sich mit 11 Monaten in der Tonsilla palatina, dahingegen fand sich der größte Median (48 Monate) im Weichgaumen bzw. der Uvula (Abb. 66).

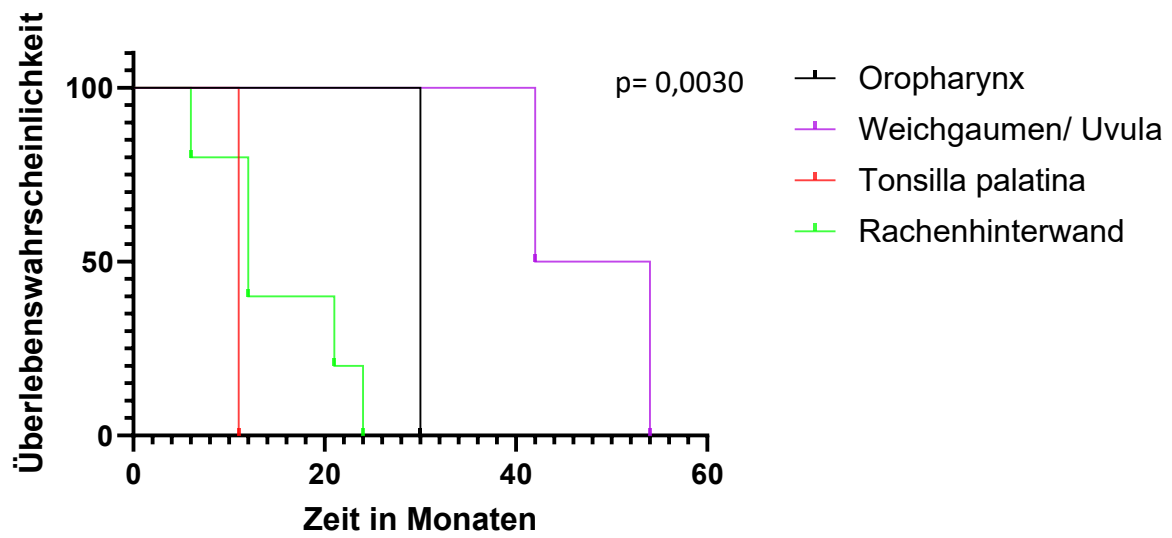


Abbildung 67: DFS in Zusammenhang mit der Lokalisation und einer geringen Expression an Taspase1

## 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabellen A 1.1 und A 1.2 im Anhang fassen die Ergebnisse der Kapitel 4.3 und 4.4 zusammen.

Patienten mit einer geringen Expression von VDR waren in dieser Studie charakterisiert durch ein hohes T- und UICC-Stadium, sowie ein vermehrtes Vorkommen von Fernmetastasen. Zudem korrelierte die Lokalisation des Primärtumors mit einer geringen Expression an VDR, wobei die Vallecula bzw. die Epiglottis als prognostisch am ungünstigsten galten.

Dahingegen zeigten Patienten mit einem hohen Nikotinabusus eine hohe Expression von VDR und waren überwiegend männlich. Die Lokalisation und die Therapieoptionen beeinflussten zusätzlich das Überleben dieser Patienten.

Ein Rezidiv trat vor allem bei Patienten mit einer geringen VDR-Expression, einem erhöhten Alkoholkonsum, sowie einem erhöhten T- und N-Stadium auf.

Die DFS wurde bei Patienten, welche eine hohe Expression von VDR aufwiesen, durch das T-, N-, M-Stadium signifikant beeinflusst. Auch der Nikotinkonsum spielte bei dem Auftreten von Rezidiven eine signifikante Rolle.

Das Überleben von Patienten mit einer geringen Expression von Ki67 wurde von dem T-, N-, M-Stadium geprägt. Außerdem beeinflusste die Lokalisation die 5-Jahres-Überlebensrate.

Patienten mit einer hohen Ki67-Expression waren hinsichtlich des Überlebens durch ein hohes T-, M-, sowie UICC-Stadium charakterisiert. Zudem betraf dies überwiegend Männer und Patienten mit einem hohen Nikotinkonsum. Die Therapieoptionen sowie die Lokalisation des Primärtumors beeinflussten das Überleben zusätzlich.

Das krankheitsfreie Überleben wurde bei Patienten mit einer geringen Ki67-Expression von dem Nikotinkonsum und dem N-Stadium beeinflusst.

Sowohl der Nikotin- als auch der Alkoholkonsum prägten die DFS von Patienten in Zusammenhang mit einer hohen Ki67-Expression.

Patienten mit einer geringen Taspase1-Expression waren charakterisiert durch ein hohes Grading, sowie UICC- und M-Stadium.

Eine hohe Expression von Taspase1 korrelierte mit dem Geschlecht und der Lokalisation des Tumors.

Das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit einer geringen Taspase1-Expression wurde von der Lokalisation des Primärtumors beeinflusst.

Dahingegen prägten der Nikotinkonsum und das N-Stadium das krankheitsfreie Überleben von Patienten in Bezug zu einer hohen Taspase1-Expression.

## 5 Diskussion

### 5.1 Evaluation von Material und Methoden

#### 5.1.1 Die Repräsentativität des Patientenkollektivs

Die generierten Daten bezüglich des Erkrankungsbildes zu einigen Patienten erwiesen sich als zu gering, um in das Kollektiv mit aufgenommen zu werden, was zu einem Ausschluss eben dieser Patienten aus der hiesigen Statistik führte. Ausgeschlossen wurden zudem TMAs, welche lediglich befallene Lymphknoten zeigten bzw. ausgestanzt vorlagen und somit nicht beurteilt werden konnten.

Da diese Arbeit sich mit dem Expressionslevel von VDR beschäftigt, ist die Homogenität des Patientenkollektivs relevanter als die Betrachtung eines vollständigen klinischen Erkrankungsbildes.

Es ergab sich ein Kollektiv von 117 Patienten. Eine Vergrößerung der Stichprobe hätte durch Erweiterung der Einschlusskriterien oder durch Inkaufnahme einer unvollständigen Datenlage erzielt werden können. Hierdurch hätte sich ein inhomogenes Kollektiv und ein daraus sich resultierendes, niedrigeres Niveau der Datenkohärenz ergeben. Die angewandte Selektion in Bezug auf die Ein- und Ausschlusskriterien sowie die Krankengeschichten der Patienten, ermöglicht eine Vergleichbarkeit der Datensätze untereinander. Jene ist relevant, um eine Grundlage für eine größere Studie zu schaffen.

In dem Patientenkollektiv waren deutlich mehr Männer (51%) als Frauen (32%) vertreten. Dies entspricht den Daten, welche dem deutschen Krebsregister in den Jahren 2017 und 2018 vorlagen [6]. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei 61 Jahren, was mit den dort aufzufindenden Daten übereinstimmt.

Zu den Risikofaktoren zählt unter anderem der Konsum von Tabak, der in diesem Fall von 70% der Befragten getätigt wurde. Ein Anteil von 33% gab an über 20 packyears zu sich genommen zu haben. Ein genauso großer Teil des Patientenkollektivs sagte aus einen riskant erhöhten Alkoholkonsum zu betreiben.

Schlussendlich ist eine Stichprobe von 117 Patienten nicht ausreichend, um eine statistische Relevanz innerhalb einer Subgruppe in Bezug auf diverse klinische Merkmale festzustellen. Dies zeigt sich insbesondere an der vergleichsweise geringen Anzahl von stark VDR exprimierenden Tumorzellen.

Die Ergebnisse bezüglich der Gesamtüberlebenszeitanalyse, welche mittels Kaplan-Meier-Test durchgeführt wurden, sind vergleichbar mit den Ergebnissen des deutschen

Krebsregisters [6]. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die vorliegende Stichprobe von 117 Patienten repräsentativ ist.

Hinsichtlich der UICC-Stadien, des Alkohol- und Nikotinkonsums sowie des Auftretens von Rezidiven zeigen sich in Vergleich zur Literatur erwartende Verläufe. Dies deutet auf eine solide retrospektive Datenerhebung sowie ein repräsentatives Patientenkollektiv hin.

### 5.1.2 Immunhistochemische Färbungen der TMAs

Makroskopisch betrachtet fallen bei den TMAs ungleich verteilte Areale mit unterschiedlich starken Färbeintensitäten auf. Zusätzlich bargen die TMAs selbst diverse Fehlermöglichkeiten, hierzu zählen die Schichtdicke der Cores und die Heterogenität des zu untersuchenden Tumorgewebes. Neben Schrumpfungartefakten, welche falsch-positive Färbungsergebnisse hervorrufen, spielte auch das Ausstanzungsverfahren der Cores eine Rolle. So kam es vereinzelt zu einer zu geringen Gewinnung an Tumorgewebe bzw. einer unvollkommenen Ausstanzung, weswegen einige TMA Cores nicht verwendbar waren.

Die Qualität der VDR-Färbung, bzw. der als Vergleich dienenden Ki67- und Taspase1-Färbung, ist vergleichbar mit weiteren immunhistologischen Untersuchungen der VDR Expression [5]. Für diese Art der Färbung waren diverse Schritte sowie eine häufige Beurteilung des Vorgehens notwendig. Jene erfolgte durch die Mitarbeiter des Instituts für allgemeine Pathologie an der Universitätsmedizin Mainz. Diese sorgfältige Analyse sorgte für eine hohe Qualität der Antikörperfärbung mittels VDR, Taspase1 und Ki67.

### 5.1.3 Auswertungen der Färbungen mittels QuPath

Die Auswertung der TMAs erfolgte mit der Opensource Software „QuPath“, welche eine standardisierte und genaue Analyse der Zellen erlaubt. Zwar wurden die Voreinstellungen sehr sorgfältig gesetzt, jedoch erkannte die Software nicht alle Zellen bzw. markierte nicht alle Tumorzellen als jene. Zudem wurden nicht alle Zellgrenzen korrekt erfasst. Um jene Fehlerquelle zu minimieren, wurden regelmäßige Kontrollen durchgeführt, sodass von repräsentativen Werten auszugehen ist.

In Kapiteln 3.4.1 wurden „Classifier“ erwähnt, mithilfe welcher „QuPath“ zwischen Tumorzellen und Stromazellen unterscheiden konnte. Zusätzlich wurden „Thresholds“ eingerichtet, anhand welcher eine Differenzierung in „schwach“, „moderat“ und „stark“ bezüglich der Färbeintensität erfolgte. Zwar wurden von „QuPath“ unterschiedliche „Thresholds“ vorgeschlagen, jedoch wurden für alle TMAs sowohl die gleichen „Thresholds“ als auch der gleiche „Classifier“ verwendet, um eine bessere Vergleichsmöglichkeit zu gewährleisten. Die Auswahl der

„Thresholds“ erfolgte jedoch nach subjektiven Gesichtspunkten, was die Aussagekraft der Korrelationsanalyse einschränkt. Der, für jedes TMA individuell berechnete, H-Score ermöglicht jedoch eine gute statistische Vergleichbarkeit der unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungen. Anhand des H-Scores kann ermittelt werden, wie hoch die Antigenexpression in den entsprechenden Gewebeproben ist. Da dies unabhängig von der jeweiligen Färbeintensität geschieht, können die Korrelationsanalysen als Indikator für eine wechselseitige Beeinflussung der Expression des Proliferationsmarkers und des Rezeptors dienen.

Grundsätzlich erwies sich die Auswertung mithilfe von „QuPath“ als effizientere Methode als das manuelle Auslesen der histologischen Schnitte. Auch in Zukunft kann jenes verwendet werden, um semiquantitative Analysen vorzunehmen.

#### 5.1.4 Der Einfluss der Zellzahl auf die Auswertung

Wie Tab.6 entnommen werden kann, liegen Unterschiede in dem Mittelwert und dem Median der totalen Zellzahl sowie der Anzahl positiv gefärbter Zellen vor. Dies ist ein multifaktorielles Geschehen und hängt unter anderem von der Schnittebene des Tumors ab. Diese ist auf jedem TMA verschieden und bedingt somit eine unterschiedliche Anzahl an auswertbaren Zellen. Zudem ist das Tumorgewebe stark heterogen, dass auf den Cores eine unterschiedliche Quantität an Stroma bzw. Tumorgewebe vorlag. Hinzu kommt das Vorhandensein von Lymphozyten und Granulozyten, welche ebenfalls die Zellzahl beeinflusst. Um eine Differenzierung zu ermöglichen wurde vorab ein „Classifier“ eingerichtet, welcher jene Zellen herausfiltert und somit nicht in die Zellzahl einberechnet.

Falsch-positiv markierte, sowie nicht erkannte Zellkerne können zu einer Verfälschung der Ergebnisauswertung führen. Jene Fehlerquelle wurde zusätzlich anhand von Stichproben kontrolliert.

Bei der Nachkontrolle fanden sich keine relevanten Beeinflussungen, sodass alle bereits analysierten Cores eingeschlossen werden konnten. Die Zellzahl lässt keine Schlussfolgerung in Bezug auf die Qualität der Färbung oder ihrer Analyse zu. Geringe Zellzahlen gelten jedoch als wenig repräsentativ, da sie als anfälliger für Fehler gelten.

#### 5.1.5 Der Einfluss der Mehrfachfärbung des Gewebes

Differenzen in der Mehrfachfärbung eines Gewebes sind nicht zwangsläufig als Differenzen in der Validität zu deuten. Viel mehr weisen sie auf die Heterogenität des untersuchten Materials hin. Hier könnte es von Interesse sein homogenes und heterogenes Tumorgewebe getrennt

zu analysieren. Dies würde eine vorausgehende mikroskopische Einteilung voraussetzen, welche subjektiven Merkmalen unterliegen würde. Zusätzlich müssten die Charakteristika der Heterogenität und Homogenität und deren Grenzen zunächst definiert werden. Ein Tumor besteht aus verschiedenen Subpopulationen an Zellen und somit aus diversen Rezeptorexpressionen, welche durch die Umgebung des Tumors beeinflusst werden. Hier wäre eine gezielte Entnahme aus unterschiedlichen Tumorbereichen, wie der Mitte und dem Rand sowie diverser Morphologie angezeigt, um somit eine bestmögliche Repräsentativität der Färbung zu erhalten.

Der H-Score ist eine geeignete Methode, um extreme Werte abzumildern und gilt als unempfindlich gegenüber Extremen. Im Gegensatz hierzu wäre ein Mittelwert anfälliger. Ob die Verwendung eines Tumorgewebes mit homogener VDR-Expression in Hinblick auf molekulare Therapien und der Repräsentativität der Proben eindeutige Aussagen liefern, bedarf weiterer Klärung.

#### 5.1.6 Abschließende Bewertung von Material und Methoden

Kapitel 5.1.1 verdeutlicht die Relevanz in der Auswahl eines Patientenkollektivs, wobei das Kollektiv vergleichbaren Studien entspricht. Anhand von unterschiedlichen Charakteristika zeigt sich im Vergleich zu der Literatur eine Repräsentativität. Die Auswertung der TMAs mit Hilfe von „QuPath“ wurde im Rahmen dieser Arbeit neu etabliert. Trotz aufgetretener Schwierigkeiten und den hier aufgezeigten Lösungsansätzen, können dennoch das verwendete Material und die Methoden überwiegend positiv bewerten. Die Verwendung von TMAs erlaubt eine gleichzeitige Färbung der Cores und somit eine standardisierte Betrachtung des Gewebes. „QuPath“ ermöglichte, nicht zuletzt durch die Berechnung der H-Scores, effiziente statistische Analysen und darüber hinaus schlussfolgernde Aussagen.

#### 5.1.7 Allgemeine Einschränkung der Studie

Der hier zugrundeliegenden Dissertation lagen ausschließlich die Expressionslevel von VDR vor, es fehlten jedoch die Serum-Vitamin D-Werte. Wie in den Kapitel 2.3 und 2.4 beschrieben, ist die Regulation der VDR-Expression komplex und abhängig von dem Liganden Vitamin D (VitD). Für eine gesicherte Aussage wären somit die Serum-VitD-Werte von Nöten gewesen, die wiederum hier nicht vorlagen. Die Serumspiegel von VitD sind entscheidend für die Beurteilung des VitD-Status und seiner potenziellen biologischen Effekte. Ohne diese Angaben ist es schwierig, direkte Korrelationen zwischen der Expression des VDR und dem klinischen Verlauf der Erkrankung festzustellen. Das Fehlen von Serumwerten könnte zu dem bedeuten, dass mögliche Zusammenhänge zwischen dem VitD-Status und der VDR-

Expression übersehen werden. Es gibt diverse Faktoren, wie beispielsweise die geografische Lage, die Sonneneinstrahlung sowie die Ernährung, welche den Serumspiegel von VitD beeinflussen können. Diese Variabilität zeigt, dass die Messung des VitD-Spiegels relevant ist, um eine Schlussfolgerung über die Rolle von VDR in HNSCC ziehen zu können. Das Zusammenspiel zwischen VDR und VitD bezüglich klinischer und therapeutischer Relevanz in HNSCC wurde von Koll et al. untersucht [87]. Sowohl die Expression von VDR als auch das VitD-Serumlevel korrelierten hier mit diversen klinischen Parametern, unter anderem der Tumorklassifikation. Die schlechteste Prognose ging mit einem geringen Level an VitD einher. Ein geringes Level an VitD zeigte sich vor allem bei den weiblichen Probanden. Jene hatten ein erhöhtes Risiko an HNSCC zu erkranken.

Die Untersuchung von VDR in HNSCC zeigt vielversprechende Ansätze für zukünftige Forschungsarbeiten, jedoch sollten die Einschränkungen, hier insbesondere das Fehlen von Serum-VitD-Werten einbezogen werden. Zukünftige Studien sollten somit den VitD-Status der Patienten erfassen, um die Kausalität zwischen VDR-Expression und den klinischen Ergebnissen besser zu verstehen und potenzielle therapeutische Ansätze zu entwickeln, welche auf VDR abzielen.

## 5.2 VDR-Expression in Tumorzellen

### 5.2.1 Detektion des VDR in Gewebe

Zunächst muss die gewählte Einteilung in eine „hohe“ und eine „geringe“ Expression an VDR kritisch betrachtet werden. So zeigten sich H-Scores zwischen 4,43 und 181,71. Um eine gute Vergleichbarkeit mit Ki67 und Taspase1 zu erhalten, wurde für jeden Parameter ein individueller Grenzwert festgelegt. Als „cut off“ galt hier der Median der jeweiligen H-Scores. Jener lag für Ki67 bei 67,545, für VDR bei 47,235 und für Taspase1 bei 142,115.

### 5.2.2 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich der Overall Survival

Es konnte ein Zusammenhang zwischen einer geringen Expression von VDR und dem UICC-Stadium und dem T-Stadium festgestellt werden. Eine hohe Expression an VDR hatte in dieser Studie keinen Einfluss auf das UICC- bzw. T-Stadium. Sharaf et al. fanden eine negative Korrelation zwischen VDR-Expression und dem Staging des Tumors [88]. Auch hier korrelierte eine geringe VDR-Expression mit einem erhöhtem T-Stadium und einer verringerten Overall Survival.

Generell ist das Vorhandensein von Metastasen mit einer geringeren Lebenserwartung verknüpft, was auch hier der Fall war. Kommt es zusätzlich zu einer niedrigen Expression an VDR, so verringert sich die Überlebensrate sowohl bei dem Vorhandensein von Fernmetastasen als auch bei einem Fernbleiben dieser. Dinga et al. stellten in ihrer Studie aus dem April 2022 ebenso eine negative Korrelation zwischen Knochenmetastasen und VDR fest [89]. Hier war ein niedriges Expressionslevel des Markers mit einem Vorkommen von Metastasen sowie einer geringeren Overall Survival und einer reduzierten Disease Free Survival assoziiert.

Sowohl eine geringe als auch eine hohe VDR-Expression in Relation zu der Lokalisation zeigten einen statistischen Zusammenhang in Bezug zu der 5-Jahres-Überlebensrate. Insbesondere ein Tumor, welcher in der Rachenhinterwand oder der Vallecula bzw. Epiglottis lokalisiert ist, geht mit einer schlechten Prognose einher. Ein Vergleich mit weiteren Studien ist an dieser Stelle nicht möglich, da bezüglich der Lokalisation von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen und des VDR die Datenlage sich als äußerst gering darstellt.

Ein Zusammenhang bestand zudem zwischen der VDR-Expression und dem Geschlecht des Patienten. Grundsätzlich hat das männliche Geschlecht eine negativere Prognose als das weibliche. Hier zeigte sich für eine hohe VDR-Expression eine Signifikanz in Bezug auf die Overall Survival. In der von Qadari et al. durchgeführten Studie ergaben sich hinsichtlich gastrointestinalen Krebserkrankungen ähnliche Erkenntnisse [90]. Das männliche Geschlecht

begünstigte hier eine Veränderung in einem Allel des VDR, was wiederum mit einer erniedrigten Overall Survival einherging. An dieser Stelle kann für die vorliegende Arbeit keine genetische Veränderung diskutiert werden, da eine Erforschung dieser nicht im Rahmen der vorliegenden Dissertation lag. Hierzu würde sich ein zukünftiges Forschungsprojekt anbieten.

Im Gegensatz beeinflusst eine erhöhte VDR-Expression in Zusammenhang mit verschiedenen Therapieoptionen die Überlebensrate. So zeigte sich die geringste Überlebensrate bei einer hohen VDR-Expression in Kombination mit einer Radiotherapie. Eine geringe VDR-Expression geht nicht mit einer statistischen Relevanz bezüglich der Therapieoptionen einher, wodurch es sich als schwierig gestaltet eine Differenz zwischen einer hohen und geringen Expression an VDR in Relation zu den Therapieoptionen zu erkennen.

Eine hohe Expression an VDR korrelierte zudem mit dem Nikotinabusus. Zwar gibt es keinen wissenschaftlichen Hinweis in Publikationen darauf, dass eine Korrelation zwischen dem Nikotinabusus und einer Expression an VDR in HNSCC Tumoren besteht, jedoch fand sich in der Studie von Laczmanski et al. eine Korrelation mit Tabak-induzierten Krebsarten [91]. Hier reduzierte das Vorhandensein des „t“-Allels in dem Taq1-Polymorphismus von VDR das Risiko an Nikotin-induzierten Tumoren zu erkranken. Dies könnte in weiteren wissenschaftlichen Arbeiten überprüft werden.

### 5.2.3 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich des krankheitsfreien Überlebens

Sowohl eine niedrige als auch eine hohe Expression an VDR korrelierten mit dem T-Stadium. Höhere Stadien (abgesehen von einzelnen Ausreißern) wiesen hier hinsichtlich der DFS eine verringerte 5-Jahres-Überlebenszeit auf. Im Vergleich zeigte sich eine größere 5-Jahres-Überlebensrate bei einer hohen Expression an VDR. Xia et. al zeigten in ihrer Meta-Analyse, dass die Expression von VDR in unterschiedlichen Tumorarten diverse Reaktionen hervorrufen kann [92]. Beispielsweise korrelierte eine hohe Expression an VDR in Mammakarzinomen mit einem geringen T-Stadium.

Bezüglich der N-Stadien ergab sich ein ähnliches Resultat wie bei den T-Stadien. Die Studie von Brozyna et al. untermauert diese Hypothese ebenfalls [93]. Je stärker der Lymphknotenbefall der Melanome war, desto weniger VDR wurde exprimiert.

Der Alkoholkonsum korreliert mit einer geringen Expression an VDR. Ein nicht vorhandener Alkoholkonsum galt hierbei als prognostisch am günstigsten. Grundsätzlich gilt Alkohol als Risikofaktor in Bezug auf HNSCC. Die Studie von Wrosek zeigt, dass das FokI-Gen in VDR mit einer Impulsivität in Bezug auf Alkoholkonsum einhergeht [94]. Diese Impulsivität wiederum kann zu einer Alkoholabhängigkeit führen, was wiederum die Entstehung eines HNSCC

fördern kann. Um diese Hypothese weiter zu stützen, müssten Forschungen durchgeführt werden, welche, wie diese Arbeit, die Expression von VDR in Subgruppen unterteilen und eine potenzielle Korrelation mit dem Alkoholkonsum untersuchen.

Eine hohe Expression von VDR korrelierte mit dem Nikotinabusus in Bezug auf die DFS. Dies entspricht den in Kapitel 5.2.2 diskutierten Ergebnissen. Somit senkt eine hohe Expression in Kombination mit dem Nikotinabusus nicht nur die OS, sondern auch die DFS. Wenige Studien beschäftigen sich mit einer potentiellen Expression zwischen VDR und einem Nikotinabusus, die meisten Studien beziehen sich diesbezüglich auf VitD. Wie die Studie von Afzal et al. zeigt, korreliert der VitD Status invers mit dem Risiko an einem Nikotin-assoziierten Tumor zu erkranken [95]. Somit würden hypothetisch Patienten, die VitD zu sich nehmen und an einem Tabak-induzierten Tumor erkrankt sind, von der Gabe dessen profitieren. Wie sich dies auf VDR auswirkt, ist jedoch ungewiss.

Auch das Vorhandensein von Fernmetastasen in Verbindung mit einer hohen Expression an VDR beeinflusst die DFS. Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen aus Kapitel 4.3.1. Hier korrelierte eine geringe Expression an VDR mit dem Vorkommen von Fernmetastasen. Dies entspricht auch bisherigen wissenschaftlichen Studien. Ding et al. fanden in ihrer Studie eine inverse Korrelation zwischen der VDR-Expression und dem Vorkommen von Fernmetastasen [89]. Eine geringe Expression an VDR war hier mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Dieser Widerspruch kann darin begründet liegen, dass nicht alle TMAs Daten bezüglich einer Rezidiv-Erkrankung aufwiesen. Von den 117 TMAs wissen lediglich 30 TMAs Rezidive auf. Diese Anzahl kann nicht als repräsentativ gewertet werden und gilt als fehleranfällig.

## 5.3 Ki67-Expression in Tumorzellen

### 5.3.1 Detektion des Ki67 im Gewebe

Die in Kapitel 5.2.1 erwähnte Einteilung der Expression in „hoch“ und „niedrig“ erfolgte auch für die mittels Ki67-Antikörper gefärbten Schnitte. Um eine präzise Vergleichbarkeit zu erzielen, wurde ebenfalls der Median des H-Scores (67,545) als Grenzwert festgelegt.

### 5.3.2 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich der Overall Survival

Es fand sich eine statistische Signifikanz in Bezug auf das T-Stadium und einer geringen sowie hohen Ki67-Expression. Die negativste Prognose ging mit einer geringen Ki67-Expression und einem T-Stadium von 4a einher. Die längste Überlebensrate zeigte sich bei Stadium 1 und einer hohen Expression von Ki67. Die Studie von Bubendorf et al. belegt, dass eine erhöhte Ki67-Expression mit einem fortgeschrittenen T-Stadium bei Prostatakarzinomen einhergeht [96]. Inwiefern dies auf HNSCC übertragen werden kann, ist fraglich.

Bezüglich des Vorkommens von Fernmetastasen ließ sich ein signifikanter Einfluss in Hinblick auf die Ki67-Expression feststellen. Grundsätzlich geht ein Vorkommen von Fernmetastasen mit einer geringeren 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit einher. Hier fand sich zusätzlich die Tatsache, dass eine geringe Expression an Ki67 die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit noch weiter senkt. Dies wird durch die Studie von Pui et al. unterstützt [97]. In jener zeigte sich eine Verringerung des Gesamtüberlebens bei Vorkommen von Fernmetastasen und einer geringen Expression an Ki67 in Bezug auf Brustkrebs. Die Therapieentscheidungen bei einer Brustkrebserkrankung werden unter anderem von Ki67 abhängig gemacht. Eine geringe Expression geht mit einem geringen Wachstum des Tumors einher und bietet für eine potenzielle Chemotherapie eine schlechtere Grundlage. Grundsätzlich können Tumore, die ein aggressiveres Wachstum aufweisen, gezielter durch eine Chemotherapie behandelt werden.

Zudem ergab sich bezüglich des Geschlechts und einer hohen Ki67-Expression eine statistische Signifikanz in der 5-Jahres-Überlebensrate. Hier zeigte sich eine Kombination aus dem männlichen Geschlecht und einer hohen Expression an Ki67 als prognostisch am ungünstigsten. Die Studie von Wen et al. untersuchte über 32 Studien in einer Meta-Analyse, unter anderem um geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Expression von Ki67 festzustellen [98]. Dabei zeigte sich, dass eine hohe Expression an Ki67 statistisch öfter bei dem männlichen Geschlecht vorkam. Jedoch bezog sich diese Studie ausschließlich auf die asiatische Population. Die Wissenschaft ist sich in diesem Punkt allerdings nicht einig, so liegen Studien vor, die eine Korrelation des Geschlechts mit Ki67 widerlegen. Hier sind demnach weiterführende Studien nötig [99].

Ebenso wurde eine Relevanz in Hinblick auf die Lokalisation des Primärtumors festgestellt. Die schlechteste Prognose, unabhängig von dem Level der Expression, hatten Primärtumore, die in der Vallecula bzw. Epiglottis lokalisiert waren. Eine Aussage bezüglich des Zungengrundes kann nicht getroffen, da hierzu keine Daten vorlagen. Hier wäre eine weiterführende Studie notwendig, um einen potenziellen Zusammenhang zwischen Ki67 und der Lokalisation des Tumors im Kopf-Hals-Bereich zu untersuchen.

Zwar ließ sich bezüglich der Therapieoptionen ein Zusammenhang mit einer hohen Ki67-Expression erkennen, jedoch ist dieser nicht vergleichbar mit einer verringerten Expression an Ki67, da sich hier keine statistische Relevanz feststellen ließ. Ki67 bildet, wie die Studie von Yang et al. zeigt, in diversen Formen ein therapeutisches Ziel [100]. So kann zum einen an eine RNA-Therapie gedacht werden, zum anderen kann mit einem onkolytischen Adenovirus gearbeitet werden.

Das UICC-Stadium zeigte lediglich in Bezug auf eine hohe Expression von Ki67 eine Korrelation. Die Studie von Ma et al. belegt diese Ergebnisse [101]. Jene zeigte einen Anstieg des UICC-Stadiums, wenn die Expression von Ki67 sich ebenfalls vergrößerte.

Der Nikotinkonsum korrelierte hinsichtlich der OS ebenfalls mit einer hohen Expression von Ki67. Zwar lag keine Studie vor, in welcher es eine Korrelation zwischen Ki67 und dem Nikotinkonsum hinsichtlich HNSCC untersucht wurde, jedoch gibt es unter anderem eine Studie bezüglich Blasenkarzinomen [102]. Jene wies auf, dass Tabakkonsum mit hochgradig differenzierten Blasenkarzinomen einhergeht, welche zudem mehr Ki67 exprimieren. Diese Studie involvierte jedoch lediglich Probanden aus Indien, weswegen eine Repräsentativität fragwürdig ist.

Die Entwicklung von Lymphknoten-Metastasen (N-Stadium) korrelierte ausschließlich mit einer geringen Expression von Ki67. Inwiefern eine hohe Expression an Ki67 somit einen Einfluss auf das N-Stadium hat, kann aufgrund des hohen p-Wertes nicht festgestellt werden. In Bezug auf HNSCC ist ein fortgeschrittenes N-Stadium mit einer hohen Expression an Ki67 assoziiert [103]. Dies rührt daher, dass Tumore, welche eine große Menge an Ki67 exprimieren, schneller wachsen und als aggressiver gelten. Die Diskrepanz zwischen der genannten Studie und der, in dieser Arbeit abweichenden, Ergebnisse kann an dem kleinen Patientenkollektiv von 117 Patienten liegen.

### 5.3.3 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich des krankheitsfreien Überlebens

Die gleiche Schlussfolgerung ergibt sich in Bezug auf das N-Stadium. Die niedrigste Prognose in Hinblick auf die Disease Free Survival zeigt sich bei einer niedrigen Ki67-Expression und

einem starken Befall der Lymphknoten (Stadium 2c). Diese Ergebnisse stehen wie in Kapitel 5.3.2 bereits erwähnt in Kontrast zu der aktuellen Studienlage. In der Studie von Tawfik et al. wurden 103 Patienten mit Brustkrebs hinsichtlich der Ki67-Expression untersucht, mit der Bilanz, dass Patienten, die Lymphknotenmetastasen mit einer geringen Expression des Proliferationsmarkers vorwiesen, ein vergleichsweise größeres Gesamtüberleben aufwiesen [104].

Auch der Nikotinabusus zeigte bezüglich der DFS eine Korrelation mit einer geringen sowie hohen Expression von Ki67. Die Ergebnisse waren ähnlich und unterschieden sich nicht in der 5-Jahres-Überlebensrate, weswegen hier keine Hypothese aufgestellt werden konnte.

Des Weiteren wies der Alkoholkonsum eine direkte Korrelation mit einer hohen Expression von Ki67 auf. Die Studie von Lawer et. al untersuchte die Wirkung von Alkohol auf die Ki67-Expression [105]. Hier zeigte sich, dass ein starker Alkoholkonsum mit einer erhöhten Expression von Ki67 einherging. Dies wiederum entsprach den Ergebnissen dieser Arbeit.

## 5.4 Taspase1-Detektion in Tumorzellen

### 5.4.1 Detektion der Taspase1 im Gewebe

Um eine präzise Vergleichbarkeit zu erzielen, wurde auch hier die gleiche Einteilung in „hoch“ und „niedrig“, wie sie in Kapitel 5.2.1 erwähnt wurde, gewählt. Ein H-Score von 142,115 galt hierbei als Grenzwert.

### 5.4.2 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich der Overall Survival

Zwischen den UICC-Stadien und einer geringen Expression von Taspase1 konnte ein Zusammenhang festgestellt werden. Die Kombination aus einem fortgeschrittenen Stadium und einer geringen Expression an Taspase1 galt hierbei als prognostisch ungünstig. Erste wissenschaftliche Erkenntnisse lieferte die Dissertation von Claudia Sophie Eger [106]. Hier galt ein hohes UICC-Stadium als prognostisch ungünstig. Zudem verkürzte eine hohe Taspase1-Expression die Überlebenszeiten des Patientenkollektivs.

Zudem konnte eine statistische Signifikanz zwischen dem Vorkommen von Fernmetastasen und der Expression von Taspase1 festgestellt werden. Eine hohe Expression an Taspase1 in Verbindung mit dem Vorkommen von Fernmetastasen zeigte die geringste Overall Survival. Die höchste Overall Survival entstand bei einer Kombination aus geringer Taspase1-Expression und einem Fehlen von Fernmetastasen. Taspase1, welche hauptsächlich in Primärtumoren aufgefunden werden kann, reguliert nicht nur die Proliferation, sondern auch das Entstehen von Metastasen [107]. Ein Vorkommen von Metastasen in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-und-Hals-Bereichs ist wiederum mit einer verringerten Overall Survival verknüpft [108].

Das weibliche Geschlecht in Verbindung mit einer hohen Expression an Taspase1 verringerte die Overall Survival. Ein statistischer Zusammenhang zwischen der Expression von Taspase1 und dem Geschlecht wurde auch in der Studie von Jang et al. diskutiert [109]. Jene untersuchte die Wirkung von Taspase1 auf hepatozelluläre Tumore und fand hier eine Signifikanz. Inwiefern das weibliche Geschlecht hier eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit aufwies, wurde nicht in dem Artikel diskutiert.

Eine statistische Signifikanz konnte zudem zwischen einer geringen Expression an Taspase1 und dem Grading mit Bezug zur Overall Survival festgestellt werden, wobei Grad 3 als prognostisch am günstigsten galt. Die Studie von Jiang et al. untersuchte die Expression von Taspase1 bei Patienten mit hepatozellulären Tumoren [109]. Die Taspase1-Expression war hier im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht und assoziiert mit einem höheren Grading.

Da hier jedoch nicht mit H-Scores gearbeitet wurde und sich die Studie auf eine andere Tumorart bezog, ist die Vergleichbarkeit eingeschränkt.

#### 5.4.3 Einfluss auf klinische Parameter bezüglich der Disease Free Survival

Bezüglich der Disease Free Survival wies die Lokalisation bei einer geringen Expression an Taspase1 eine statistische Signifikanz auf. Eine vergleichende Studie heranzuziehen gestaltete sich hier als schwer, da die Einteilungen der Lokalisation variieren. Zudem lagen nur wenig Daten zu Rezidiven vor, was eine statistische Auswertung erschwerte und dazu führte, dass es nur ein relevantes Ergebnis gab. Ein größeres Patientenkollektiv mit einem häufigeren Vorkommen von Rezidiven hätte an dieser Stelle zu einer verbesserten Repräsentativität geführt.

Der Nikotinkonsum wies eine Korrelation mit einer erhöhten Expression an Taspase1 auf. Insbesondere eine hohe Expression von Taspase1 und ein hoher Tabakkonsum galten als prognostisch ungünstig hinsichtlich der DFS. Hierzu fanden sich während der Literaturrecherche keine wissenschaftlichen Studien, weswegen hier weitere Forschungen von Nöten sind.

Zudem gab es eine Korrelation zwischen dem N-Stadium und einer hohen Expression an Taspase1. Auch hier fand sich keine Literaturquelle, was ein Belegen bzw. widersprechen der Hypothese erschwert.

## **5.5 Korrelation zwischen der Ki67-, Taspase1- und VDR-Expression**

Hinsichtlich potenzieller Zusammenhänge der einzelnen prognostischen Marker zeigte sich ausschließlich eine Korrelation zwischen der geringen Expression von VDR und der hohen Expression der Taspase1. Je weniger VDR ausgeschüttet wurde, desto mehr Taspase1 wurde exprimiert. Bei Betrachtung des Streudiagramms (Abb. 21) zeigten sich große Unterschiede zwischen den einzelnen H-Scores hinsichtlich der Färbungen. Zur Untersuchung eines potenziellen Zusammenhangs zwischen Taspase1 und VDR lagen, zum Zeitpunkt der in dieser Dissertation durchgeführten Forschung, keine Studien vor, welche einen Vergleich oder eine Einordnung der hier vorliegenden Ergebnisse ermöglichten. Dies wäre ein Angriffspunkt für zukünftige Forschungen. So könnte zum einen die Einteilung in „gering“ und „hoch“ bezüglich der Färbungen erweitert werden, indem „moderat“ hinzugefügt wird. Zum anderen könnte das Patientenkollektiv erweitert werden, um eine größere Repräsentativität zu erreichen.

## 5.6 Abschließende Beurteilung der Thesen

Im Folgenden werden die in Kapitel 2.5 aufgestellten und im Anschluss diskutierten Thesen beurteilt.

1. Für Patienten mit einer hohen VDR-Expression zeigte sich keine verkürzte 5-Jahres-Überlebensrate.
2. VDR korrelierte mit dem UICC-Stadium, dem TNM-Stadium, der Lokalisation, den Therapieoptionen, dem Geschlecht, sowie dem Alkohol- und Nikotinkonsum.
3. Zwischen VDR und Ki67 konnte keine Korrelation festgestellt werden, welche auf eine, durch VDR induzierte, Proliferation der Zellen hindeutet. Jedoch ließ sich eine direkte, moderate Korrelation zwischen einer niedrigen Expression von VDR und einer erhöhten Expression von Taspase1 feststellen.

## 6 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Bedeutung des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen (HNSCC), einer Tumorerkrankung mit variabler Prognose. Der VDR, ein nukleärer Rezeptor mit regulatorischer Funktion in der Genexpression, wird mit antitumoralen Effekten in Verbindung gebracht und könnte eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie von HNSCC spielen. Ziel der Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen der VDR-Expression, klinischen Parametern und der Prognose von HNSCC-Patienten, sowie potenzielle Korrelationen mit weiteren immunhistochemischen Markern zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 117 Tumorproben, in Form von Tissue Microarrays (TMAs) immunhistochemisch analysiert, wobei neben VDR auch der Proliferationsmarker Ki67 und das Enzym Taspase1 untersucht wurden. Die Expressionslevel dieser Marker wurden mittels der Opensource Software „QuPath“ quantifiziert und in Relation zu demografischen und klinischen Daten der Patienten ausgewertet. Ein besonderer Fokus lag auf dem Gesamtüberleben (OS) und dem krankheitsfreien Überleben (DFS).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte VDR-Expression nicht, wie angenommen, zu einer verringerten 5-Jahres-Überlebensrate führte. In Kombination mit klinischen Parametern ergaben sich hinsichtlich der Gesamt- sowie der Krankheitsfreien-Überlebenszeit relevante Erkenntnisse. In Bezug auf die Gesamtüberlebenszeit zeigte sich, bei einer geringen Expression von VDR, eine Korrelation mit dem UICC- und T-, N-Stadium sowie der Lokalisation. Eine erhöhte Expression von VDR korrelierte mit dem Geschlecht, der Lokalisation, dem Nikotinabusus sowie den Therapieoptionen. Bezüglich des krankheitsfreien Überlebens zeigten sich hinsichtlich einer geringen Expression von VDR eine Korrelation mit dem T- und N-Stadium sowie dem Alkoholkonsum. Bei einer hohen Expression von VDR kam es zu einer Korrelation mit dem Nikotinabusus sowie dem T-, N- und M-Stadium in Bezug auf das DFS.

Auffällig war zudem eine direkte, moderate Korrelation zwischen der Expression von VDR und Taspase1. Dies könnte darauf hindeuten, dass sowohl Taspase1 als auch VDR in denselben molekularen Prozessen involviert sind. Eine erhöhte Taspase1-Expression in HNSCC könnte somit nicht nur als Marker fungieren, sondern könnte auch Signalwege beeinflussen, die wiederum VDR fördernd sind. Eine Korrelation zwischen VDR und Ki67, welche auf eine, durch VDR-induzierte, Proliferation hindeuten könnte, wurde nicht festgestellt.

Diese Arbeit hebt die potenzielle Rolle des VDR als prognostischer Marker und als Ansatzpunkt für therapeutische Strategien bei HNSCC hervor. Eine Limitation der Arbeit bestand darin, dass kein Vitamin D verabreicht wurde, um die direkte Wirkung auf die VDR-

Expression oder mögliche therapeutische Effekte zu evaluieren. In zukünftigen Studien sollte eine potenzielle Interaktion von VDR mit weiteren molekularen Mechanismen, sowie die Möglichkeit einer VDR-modulierenden Therapie, beispielsweise durch die Gabe von Vitamin D, näher untersucht werden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Bochen, F., et al., *Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients - prevalence, prognostic value and impact on immune function*. *Oncoimmunology*, 2018. **7**(9): p. p. 2 -10.
2. Sirajudeen, S., I. Shah, and A. Al Menhali, *A Narrative Role of Vitamin D and Its Receptor: With Current Evidence on the Gastric Tissues*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(15): p. p. 1-19.
3. Futawaka, K., et al., *Transcriptional activation of the wild-type and mutant vitamin D receptors by vitamin D3 analogs*. *J Mol Endocrinol*, 2016. **57**(1): p. 23-32.
4. Bikle, D.D., *Extraskeletal actions of vitamin D*. *Ann N Y Acad Sci*, 2016. **1376**(1): p. 29-52.
5. Aya Khamis, D.G., Madita Wandrey, Qiang Lu, Shirley K. Knauer, Christoph Reinhardt, Sebastian Strieth, Jan Hagemann, and Roland H. Stauber, *The Vitamin D receptor-BIM axis overcomes cisplatin resistance in head and neck cancer*. *Cancers*, 2022: p. p. 2-16.
6. Institut, R.K., *Krebs in Deutschland für 2017/ 2018*. Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021. **13**: p. 36-40.
7. Roy, M.D., *Amitava Cancer Genetics and Therapeutics : Focus on Phytochemicals*. 2019: p. p. 7-19.
8. Routray, S., *Microbes and Oral Squamous Cell Carcinoma : A Network Spanning Infection and Inflammation*. 2022: p. p. 55-69.
9. Buselmaier, W.T., Gholamali *Humangenetik für Biologen*. 2006: p. p. 311-314.
10. *Bericht des Krebsregisters Rheinland-Pfalz 2020/21*. Krebsregister Rheinland-Pfalz: p. p.27-40
11. Arnold, W.G., Uwe *Checkliste Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde* 2011: p. p. 353-356.
12. Cardesa, A.M., Thomas; Rudolph, Pierre ; Slootweg, Pieter *Pathologie : Kopf-Hals-Region, Weichgewebstumoren, Haut*. 2009: p. p.4-29.
13. Aigner, K.R., et al., *Krebs im Kopf-Hals-Bereich*, in *Onkologie Basiswissen*. 2016. p. 171-184.
14. Vanden Broeck, D., *Human Papillomavirus and Related Diseases : From Bench to Bedside - A Diagnostic and Preventive Perspective* 2013: p. p. 1-3.
15. Roulet, J.-F.o. and S. ; Zimmer, *Prophylaxe und Präventivzahnmedizin*. 2003: p. p.212.
16. Lu, J.J.B., Luther W; Heilmann, H. -P; Molls, M; Nieder, C *Radiation Oncology : An Evidence-Based Approach*. 2008: p. p. 37-85.
17. Greene, F.L.C., Carolyn C; Fritz, April G; Shah, Jatin P; Winchester, David P *AJCC Cancer Staging Atlas*. Springer New York, 2006: p. p. 19-26.
18. Stöver, I.F., Petra, *Praxismanual Strahlentherapie*. 2010: p. p. 77-101.
19. Onno Mets, R.S., *The Radiology Assistant: TNM classification 8th edition*. 2023.
20. James d. Bierley, M.K.G., Christian Wittekind, *TNM Classification of malignant tumors*. 2022. **8th ed.**: p. p. 5-7.
21. Hiddemann, W.B., Claus R *Die Onkologie*. 2010: p. p. 29-30.
22. Damjanov, I., *Cancer grading Manual*. 2007: p. p. 6.
23. Kasper, S., *Kopf-Hals-Tumoren beim alten und geriatrischen Patienten, in Geriatrische Onkologie*. 2017. p. 1-11.
24. Siewert, J.r.R., *Praxis der Viszeralchirurgie : Onkologische Chirurgie*. 2010: p. p. 251-259.
25. Tafe, L.J., *The Molecular Pathology of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, in The Molecular Basis of Human Cancer*. 2017. p. 589-601.
26. Hermans, R., *Head and Neck Cancer Imaging* 2006: p. p. 103-143.
27. Cardesa, A.S., Pieter J *Pathology of the Head and Neck* 2006: p. p. 262-279.
28. Lucioni, M., *Practical Guide to Neck Dissection*. p. p. 31-51.
29. Klinghammer, K. and A. Schalhorn, *Kopf-Hals-Karzinome, in Klinikleitfaden Hämatologie Onkologie*. 2021. p. 612.
30. Wendt, T.G., F. Waldfahrer, and H. Iro, *Tumoren im Kopf- und Halsbereich, in Die Onkologie*. 2010. p. 1300-1334.
31. Alsahafi, E., et al., *Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(8): p. p. 2-12.

32. Izreig, S., et al., *The role of vitamin D in head and neck cancer*. Laryngoscope Investig Otolaryngol, 2020. **5**(6): p. 1079-1088.
33. McEwan, I.J., *The Nuclear Receptor Superfamily*. 2009: p. p. 3-21.
34. Gronemeyer, V.L.a.H., *The nuclear receptor: factsbook* 2002: p. p. 1-19.
35. Frigo, D.E., M. Bondesson, and C. Williams, *Nuclear receptors: from molecular mechanisms to therapeutics*. Essays Biochem, 2021. **65**(6): p. 847-856.
36. Lee, J.S., K.I. Kim, and S.H. Baek, *Nuclear receptors and coregulators in inflammation and cancer*. Cancer Lett, 2008. **267**(2): p. 189-96.
37. Schweitzer, A., S.K. Knauer, and R.H. Stauber, *Nuclear receptors in head and neck cancer: current knowledge and perspectives*. Int J Cancer, 2010. **126**(4): p. 801-9.
38. CP, D.E.O.N., et al., *Is There a Role for Sex Hormone Receptors in Head-and-neck Cancer? Links with HPV Infection and Prognosis*. Anticancer Res, 2021. **41**(8): p. 3707-3716.
39. Fathi, N., et al., *Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer*. Biomed Pharmacother, 2019. **109**: p. 391-401.
40. Carlberg, C., <Current Understanding of the Function of the Nuclear Vitamin D Receptor in Response to Its Natural and Synthetic Ligands.pdf>. p. p. 31-40.
41. Noh, K., et al., *Significance of the Vitamin D Receptor on Crosstalk with Nuclear Receptors and Regulation of Enzymes and Transporters*. AAPS J, 2022. **24**(4): p. p. 1-16.
42. Haussler, M.R., et al., *Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention*. Nutr Rev, 2008. **66**(10 Suppl 2): p. S98-112.
43. Hill, N.T., et al., *1alpha, 25-Dihydroxyvitamin D(3) and the vitamin D receptor regulates DeltaNp63alpha levels and keratinocyte proliferation*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. p. 6297-6299.
44. Haiwei Wang, X.W., Liangpu Xu, Ji Zhang, Hua Cao, <A molecular sub-cluster of colon cancer cells with low VDR expression is sensitive to chemotherapy, BRAF inhibitors and PI3K-mTOR inhibitors treatment.pdf>. 2019: p. p.8587- 8599.
45. Pandolfi, F., et al., *Immune Modulation by Vitamin D: Special Emphasis on Its Role in Prevention and Treatment of Cancer*. Clin Ther, 2017. **39**(5): p. 884-893.
46. Mahendra, A., et al., *Vitamin D and gastrointestinal cancer*. J Lab Physicians, 2018. **10**(1): p. 1-5.
47. Zulkeflee, H.A., et al., *Association of Serum Vitamin D Level and Vitamin D Receptor Expression among Newly Diagnosed Breast Cancer*. Sains Malaysiana, 2021. **50**(11): p. 3321-3332.
48. Reichrath, J.r., *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer*. 2020: p. p. 19-39.
49. Jeon, S.M. and E.A. Shin, *Exploring vitamin D metabolism and function in cancer*. Exp Mol Med, 2018. **50**(4): p. 1-14.
50. Brozyna, A.A., R.M. Hoffman, and A.T. Slominski, *Relevance of Vitamin D in Melanoma Development, Progression and Therapy*. Anticancer Res, 2020. **40**(1): p. 473-489.
51. Podgorska, E., et al., *Knocking out the Vitamin D Receptor Enhances Malignancy and Decreases Responsiveness to Vitamin D3 Hydroxyderivatives in Human Melanoma Cells*. Cancers (Basel), 2021. **13**(13): p. p. 1-12.
52. Markowska, A., et al., *Role of vitamin D3 in selected malignant neoplasms*. Nutrition, 2020. **79-80**: p. 110964.
53. Zhensheng Liu , J.I.C., Zhengdong Zhang , Erich M. Sturgis, Margaret R. Spitz and Qingyi Wei *Polymorphisms of vitamin D receptor gene protect against the risk of head and neck cancer*. 2004: p. p. 159- 164.
54. Zittermann, A., *Vitamin D im Überblick*. 2022: p. p. 17-24.
55. Bartl, R., *Osteoporose in der Praxis : Vorsorge, Diagnostik und Therapie*. 2022: p. p. 97-108.
56. *Vitamin D Binding Protein, Total and Free Vitamin D Levels in Different Physiological and Pathophysiological Conditions*. Frontiers Research Topics. 2020.
57. Wu, X., et al., *Repurposing vitamin D for treatment of human malignancies via targeting tumor microenvironment*. Acta Pharm Sin B, 2019. **9**(2): p. 203-219.

58. Mahzad Irandoust, H.N., Hossein Irandoust, <Average levels of vitamin D in different continents.pdf>. Journal of Parathyroid Disease, 2020: p. p. 7-10.
59. Aya Khamis, L.S., Eik Schiegnitz, Roland H. Stauber and Désirée Gül, *The Magic Triangle in Oral Potentially Malignant Disorders: Vitamin D, Vitamin D Receptor, and Malignancy*. International Journal of Medicine, 2023.
60. Carlberg, C. and A. Munoz, *An update on vitamin D signaling and cancer*. Semin Cancer Biol, 2022. **79**: p. 217-230.
61. Rachael Z. Stolzenberg-Solomon, R.V., Azar Azad, Pirjo Pietinen, Philip R. Taylor, Jarmo Virtamo, and Demetrius Albanes, *A Prospective Nested Case-Control Study of Vitamin D Status and Pancreatic Cancer Risk in Male Smokers*. 2006.
62. Bird, R.P., *Chapter Four - Vitamin D and cancer* Advances in Food and Nutrition Research, 2024.
63. CEDRIC F. GARLAND, F., EDWARD D. GORHAM, SHARIF B. MOHR AND FRANK C. GARLAND, *Vitamin D for Cancer Prevention: Global Perspective*. 2009.
64. Grant, A.M.a.W.B., *Vitamin D and Cancer: An Historical Overview of the Epidemiology and Mechanisms*. 2022.
65. Özge Özgen, G.Ö.E., Özlem Küçük Hüseyin, Nilgün Akdeniz, Ceylan Hepokur, Serap Kuruca, İlhan Yaylım, *Vitamin D increases the efficacy of cisplatin on bladder cancer cell lines*. 2022.
66. Chandler, P.D., et al., *Effect of Vitamin D3 Supplements on Development of Advanced Cancer: A Secondary Analysis of the VITAL Randomized Clinical Trial*. JAMA Netw Open, 2020. **3**(11): p. p. 2-9.
67. Jingxuan Chen, Z.T., Andrzej T. Slominski, Wei Li, Michał A, Jianjun Chen *Vitamin D and its analogs as anticancer and anti-inflammatory agents*. 2020.
68. Martin Grimm, M.C., Thorsten Biegner, Max Lehman, Adelheid Munz, Peter Teriete, Siegmart Reinert *Serum vitamin D levels of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and expression of vitamin D receptor in oral precancerous lesions and OSCC*. 2015.
69. Aya Khamis, D.G., Christoph Reinhardt, Madita Wandrey, Qiang Lu, Shirley K. Knauer, Sebastian Strieth, Jan Hagemann and Roland H. Stauber, *The Vitamin D Receptor–BIM Axis Overcomes Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer*. 2022.
70. Florian Bochen, B.B., Sandrina Körner, Jörg Thomas Bittenbring, Frank Neumann, Armand Koch, Klaus Bumm, Anke Marx, Silke Wemmert, Georgios Papaspyrou, David Zuschlag, Jan Philipp Kühn, Basel Al Kadah, Bernhard Schick & Maximilian Linxweiler, *Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients – prevalence, prognostic value and impact on immune function*. 2018.
71. Huang, Z., et al., *Vitamin D promotes the cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma by inhibiting LCN2-modulated NF-kappaB pathway activation through RPS3*. Cell Death Dis, 2019. **10**(12): p. p. 1-10.
72. Makitie, A., et al., *Vitamin D in Head and Neck Cancer: a Systematic Review*. Curr Oncol Rep, 2020. **23**(1): p. p. 2-6.
73. Yingyu Ma, D.L.T.a.C.S.J., <Vitamin D in combination cancer treatment+.pdf>. Journal of cancer, 2010: p. p. 101- 105.
74. Lang, G., *Histotechnik : Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik* 2013: p. p. 197, 201-203, 270- 271.
75. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: From the known and the unknown*. Journal of Cellular Physiology, 2000. **182**(3): p. 311-322.
76. James J.-D. Hsieh, E.H.-Y.C., and Stanley J. Korsmeyer, *Taspase1: A Threonine Aspartase Required for Cleavage of MLL and Proper HOX Gene Expression*. 2003.
77. Franghänel, J.L., W. , *Histologie*. 1999: p. p. 1-8.
78. Cerroni, L.H., et al., *Histopathologie der haut*. 2016: p. p. 15- 36.
79. Werner, M.M.D.C., Andreas M.D.; Fabiano, Alfredo M.D.; Battifora, Hector M.D., *Effect of Formalin Tissue Fixation and Processing on Immunohistochemistry*. The American Journal Of Surgical Pathology, 2000.

80. Ulrike Kämmerer, M.K., Andrea Maria Gassel, Thomas Richter, Christian Tank, Johannes Dietl, and Peter Ruck, *A new rapid immunohistochemical staining technique using the envision antibody complex*. The Journal of Histochemistry & Cytoch, 2001.
81. E Sabattini , K.B., S Ascani, S Poggi, M Piccioli, C Ceccarelli, F Pieri, G Fraternali-Orcioni, S A Piler, *The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques* JClin Pathol, 1998.
82. Patel, H.R.H., *Basic Science Techniques in Clinical Practice*. 2007: p. p. 98- 108.
83. authors, Q.d. *QuPath*. 2019-2023; Available from: <https://qupath.github.io/>.
84. Bankhead, P., et al., *QuPath: Open source software for digital pathology image analysis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. p. 1-4.
85. Humphries, M.P., P. Maxwell, and M. Salto-Tellez, *QuPath: The global impact of an open source digital pathology system*. Comput Struct Biotechnol J, 2021. **19**: p. 852-859.
86. WHO *Beim Alkoholkonsum gibt es keine gesundheitlich unbedenkliche Menge*. 2023.
87. Laura Koll, D.G., Manal I. Elnouaem, Hanaa Raslan, Omneya R. Ramadan, Shirley K. Knauer, Sebastian Strieth, Jan Hagemann , Roland H. Stauber, and Aya Khamis *Exploiting Vitamin D Receptor and Its Ligands to Target Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck*. 2023.
88. Sharaf, R.M., P.E. Eldin-Shibel, and N.A. Abd-El-Moeze, *Immunohistochemical Expression of Vitamin D Receptor (VDR) in Urinary Bladder Squamous Cell Carcinoma*. Turk Patoloji Derg, 2024. **1**(1): p. 109-116.
89. Dinga, P., et al., *Diagnostic Value of VDR in Bone Metastasis and Prognosis of Patients with Breast Cancer and Expression Correlation between Vitamin D Receptor and Hairless Protein*. Oncology Research and Treatment, 2022.
90. Wani2, J.Q.S.M.M.S.K.M.D., *Association of Vitamin D receptor gene variations with Gastric cancer risk in Kashmiri population*. 2020.
91. Lukasz Laczmanski, I.L., Felicja Lwow *Association of select vitamin D receptor gene polymorphisms with the risk of tobacco-related cancers – a meta-analysis*. 2019.
92. Xuedi Xia, F.X., Dexing Dai, An Xiong, Ruoman Sun, Yali Ling, Lei Qiu, Rui Wang, Ya Ding, Miaoying Lin, Haibo Li and Zhongjian Xie, *VDR is a potential prognostic biomarker and positively correlated with immune infiltration: a comprehensive pan-cancer analysis with experimental verification*. 2024.
93. Anna A. Brożyna<sup>1</sup>, W.J., and Andrzej T. Slominski<sup>2,3</sup>, *Decreased VDR Expression in Cutaneous Melanomas as Marker of Tumor Progression: New Data and Analyses*. 2014.
94. Małgorzata Wrzosek, A.J., Beata Kaleta, Jacek Łukaszkiwicz, Kirk Brower, Gra\_zyna Nowicka, Michał Wrzosek, Halina Matsumoto, Marcin Wojnar, *Association between Fok I vitamin D receptor gene (VDR) polymorphism and impulsivity in alcohol-dependent patients*. 2013.
95. Shoaib Afzal, S.E.B., and Børge G. Nordestgaard, *Low Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Tobacco-Related Cancer*. 2013.
96. LUKAS BUBENDORF\*, G.S., HOLGER MOCH\*, HANS-PETER SCHMID?, THOMAS c. GASSER?, PAUL JORDAN\$ ANDMICHAEL J. MIHATSCH, *Ki67 LABELLING INDEX: AN INDEPENDENTPREDICTOR OF PROGRESSION IN PROSTATE CANCER TREATED BY RADICAL PROSTATECTOMY*. 1996.
97. Lalnun Puii, L.S., Hrishi Varayathu, Samuel Luke Koramati, Beulah Elsa Thomas, Smruthy Ann Mathew, Shalaka Somayaji, Satheesh Chiradoni Thungappa, Srinivas Bj, Vinayak Munirathnam, Shivakumar Swamy, Tejaswini BN, Suhail Sayeed Mufti, Radheshyam Naik, and Basavalinga Sadasivaiah Ajaikumar, *Prognostic subset of metastatic and non-metastatic luminal B breast cancer (LBBC) subtype based on Ki67 index*. 2021.
98. Song Wen, W.Z., Chun-ming Li, Juan Hu, Xiao-ming Hu, Ping Chen, Guo-liang Shao & Wu-hua Guo *Ki-67 as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer in Asian patients: a meta-analysis of published studies involving 32 studies*. 2015.

99. Hohyun Kim, C.Y.P., Jae Hyuk Lee, Jung Chul Kim<sup>2</sup>, Chol-Kyoon Cho<sup>2</sup>, Hee Jun Kim<sup>2</sup>, *Ki-67 and p53 expression as a predictive marker for early postoperative recurrence in pancreatic head cancer*. 2014.
100. C. Yang, J.Z., M. Ding, K. Xu, L. Li, L. Mao, J. Zheng, *Ki67 targeted strategies for cancer therapy*. 2017.
101. Yan-Lei Ma, J.-Y.P., Peng Zhang, Wei-Jie Liu, Long Huang, Huan-Long Qin, *Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer*. 2009.
102. Mitsu Vaishnav, S.G., Brinda Adhaduk, *Association of smoking, p53 and Ki-67 immunomarkers with bladder neoplasms in tribal region of India*. 2022.
103. Weiyue Chen, G.L., Yongjun Chen, Feng Cheng, Xia Li, Jiayi Ding, Yi Zhong, Chunli Kong, Minjiang Chen, Shuiwei Xia, Chenying and Jiansong Ji, *Prediction of the Ki-67 expression level in head and neck squamous cell carcinoma with machine learning-based multiparametric MRI radiomics: a multicenter study*. 2024.
104. Kareem Tawfik BA, B.F.K.P., Marilyn K. Davis SCT, ASCP, Fang Fan MD, PhD, Ossama Tawfik MD, PhD *Ki-67 expression in axillary lymph node metastases in breast cancer is prognostically significant*. 2012.
105. Thomas Lawler, T.S., Qiuyin Cai, Mark D Steinwandell, Wei Zheng, Shaneda Warren Andersen, *Associations between folate and alcohol consumption and colorectal tumor Ki67 expression in the Southern Community Cohort Study*. 2023.
106. Eger, C.S., *Die klinische Relevanz der Protease Taspase1 in Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx*. 2019.
107. Nirupa Nagaratnam, S.L.D., Rebecca Jernigan, ..., Andrew J. Flint, Petra Fromme, Jose M. Martin-Garcia, *Structural insights into the function of the catalytically active human Taspase1*. 2021.
108. Daniel E. Johnson, B.B., Julie E. Bauman and Jennifer R. Grandis, C. René Leemans, Vivian Wai Yan Lui<sup>4</sup> *Head and neck squamous cell carcinoma*. 2020.
109. Jie Jiang, B.L., Ruilin Liu, Wenzhuo Yang, *Overexpression of Taspase 1 Predicts Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma*. 2021.

## 8 Anhang

### Anhangsverzeichnis

#### A Anhänge für den Ergebnisteil

##### A 1.1 Tabelle aller p-Werte in Bezug zur Overall Survival

	KI67 gering	KI67 hoch	VDR gering	VDR hoch	Taspase1 gering	Taspase1 hoch
Grading	0,4810	0,4008	0,2612	0,9617	<b>0,0446</b>	0,9302
Alter	0,9465	0,1212	0,1631	0,6235	0,4009	0,5405
Geschlecht	0,2666	<b>0,0022</b>	0,1073	<b>0,0069</b>	0,0938	<b>0,0137</b>
Lokalisation	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0014</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,3074
Rezidiv	0,9242	0,2948	0,7222	0,9813	0,4197	0,3504
Rauchen	<b>0,0088</b>	<b>0,0485</b>	0,7670	<b>0,0180</b>	0,9300	0,2627
Alkohol	0,3225	0,7058	0,2734	0,1375	0,6590	0,9574
HPV-Status	0,3519	0,5974	0,3190	0,8554	0,2591	0,5538
UICC-Stadium	0,1054	<b>0,0002</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,1208	<b>0,0430</b>	0,5161
Therapieoptionen	0,0689	<b>0,0204</b>	0,2025	<b>0,0268</b>	0,7001	0,6299
T-Stadium	<b>0,0120</b>	<b>0,0242</b>	<b>0,0001</b>	0,7820	0,9259	0,0926
N-Stadium	<b>0,0080</b>	0,9272	0,2419	0,1388	0,7112	0,9651
M-Stadium	<b>0,0191</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,8561	<b>0,0164</b>	<b>0,0096</b>

##### A 1.2 Tabelle aller p-Werte in Bezug zur Disease Free Survival

	KI67 gering	KI67 hoch	VDR gering	VDR hoch	Taspase1 gering	Taspase1 hoch
Grading	0,9835	0,7019	0,9377	0,8344	0,0846	0,7756
Alter	0,7711	0,9292	0,7909	-	0,4149	0,6176
Geschlecht	0,6815	0,6991	0,2866	0,8432	0,9742	0,4118
Lokalisation	0,7470	0,4243	0,9731	0,5470	<b>0,0330</b>	0,6039
Rauchen	<b>0,0370</b>	<b>0,0410</b>	0,1548	<b>&lt;0,0001</b>	0,3929	<b>0,0055</b>
Alkohol	0,9830	<b>0,0300</b>	<b>0,0109</b>	0,4950	0,1932	0,8063
HPV-Status	0,6455	0,4850	0,5212	0,2120	0,3334	0,5362
UICC-Stadium	0,2268	0,1688	0,3518	0,3252	0,1165	0,1476
Therapieoptionen	0,5139	0,3300	0,7364	0,1019	0,9526	0,3162
T-Stadium	0,0570	0,4061	<b>0,0367</b>	<b>0,0328</b>	0,7796	0,1053
N-Stadium	<b>0,0069</b>	0,5826	<b>0,0374</b>	<b>0,0484</b>	0,0844	<b>0,0359</b>
M-Stadium	0,1786	-	-	<b>0,0186</b>	-	0,5558

## 9 Danksagung

Einleitend gilt mein Dank meinem Doktorvater für die freundliche Überlassung des Themas sowie die fachkompetente Unterstützung.

Besonderer Dank gebührt meiner Betreuerin für ihre ausgezeichnete Betreuung und ständige Motivation in diese Promotionsarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern der AG Molekulare und Zelluläre Onkologie der HNO-Klinik der Universitätsmedizin Mainz.

Desgleichen gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für die Unterstützung bei dem Scannen der Schnitte.

Ferner danke ich meinen Freunden und meiner Familie für die immerwährende Unterstützung und Motivation bei dieser Promotionsarbeit, welche maßgeblich zum Gelingen beigetragen haben.

## **10 Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig und ausschließlich mit den erwähnten Hilfsmitteln verfasst habe. Es liegt kein weiterer Promotionsversuch vor.

# 11 Lebenslauf

**Lara Salzer**

Geboren am 21.10.1998 in Bad Dürkheim

## **Tätigkeit als Zahnärztin**

seit August 2024 Assistenz Zahnärztin in Ludwigshafen Edigheim

Juni 2024 Erteilung der zahnärztlichen Approbation durch das Landesamt  
Rheinland-Pfalz

## **Schul- und Hochschulausbildung**

2019-2024 Studium der Zahnmedizin  
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

10/2021 zweiter Abschnitt der Zahnärztlichen Vorprüfung

03/2020 erster Abschnitt der Zahnärztlichen Vorprüfung

03/2018 Abitur

2009-2018 Karolinen-Gymnasium Frankenthal

## **Promotion**

10/2022-2025 Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz,  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Forschungsgruppe:** molekulare und zelluläre Onkologie

**Thema:** Die klinische Relevanz des Vitamin D Rezeptors im Kopf-Hals-  
Plattenepithelkarzinom