

Aus der Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Die Bedeutung von Hypoxie und antitumoraler Immunaktivität für das Überleben
nach primärer Radiochemotherapie der Kopf-Hals-Region

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Universitätsmedizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Birsen Yurbas

aus

Ayancik

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Heinz Schmidberger

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heinz Schmidberger

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Bilal Al-Nawas

Tag der Promotion: 09.05.2025

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildungsverzeichnis | 1 |
| Tabellenverzeichnis | 2 |
| 1 Einleitung / Ziel der Dissertation..... | 1 |
| 2 Literaturdiskussion | 3 |
| 2.1 Grundlagen und epidemiologische Kennzahlen für bösartige Tumore der Kopf-Hals-Region | 3 |
| 2.2 Tumorinduktion durch HPV und erhöhte Radio-Chemosensibilität von HPV-positiven HNSCC sowie spezielle WHO-Klassifikation..... | 3 |
| 2.3 Einteilung HPV-assoziiertes OPSCC in der TNM-Klassifikation | 6 |
| 2.4 Prognostische Faktoren bei der Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (HNSCC) | 7 |
| 2.5 Tumorhypoxie | 9 |
| 2.6 Carboanhydrase IX | 13 |
| 3 Material und Methoden | 15 |
| 3.1 Material | 15 |
| 3.1.1 Geräte | 15 |
| 3.1.2 Chemikalien | 17 |
| 3.1.3 Primär-Antikörper | 19 |
| 3.1.4 Fluorochrome | 19 |
| 3.1.5 Lösungen und Puffer | 19 |
| 3.1.6 Gewebeentnahme und – aufbereitung..... | 22 |
| 3.2 Methoden..... | 23 |
| 3.2.1 Immunfluoreszenz..... | 23 |
| 3.2.2 Schnitthanfertigung von Paraffingewebe mittels Mikrotom..... | 24 |
| 3.2.3 Antigendemaskierung mittels Mikrowellenbehandlung | 24 |
| 3.2.4 Autofluoreszenz | 25 |
| 3.2.5 Blockierung und Inkubation des Primär-Antikörpers anti- human CD7 (Kaninchen) | 25 |
| 3.2.6 Sekundärantikörper | 26 |
| 3.2.7 Vorbereitung und Signalamplifikation des Fluorochroms | 26 |
| 3.2.8 DAPI-Kernfärbung und Eindecken der Schnitte..... | 27 |
| 3.2.9 Bildaquisition des gesamten „Whole slide“ -Scan. | 28 |
| 3.2.10 Datenanalyse mit QuPath..... | 28 |
| 3.2.11 Visuelle Datenanalyse in QuPath | 29 |
| 4 Ergebnisse..... | 31 |
| 4.1 Ergebnisse der Deskriptiven Statistik | 31 |
| 4.1.1 Patientencharakteristika | 31 |
| 4.1.2 Tumorcharakteristika | 33 |
| 4.1.3 Therapiedetails..... | 34 |
| 4.2 Ergebnisse der Überlebensanalyse..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 4.2.1 Rauchen unter Therapie..... | 36 |
| 4.2.2 Alkohol unter Therapie | 37 |
| 4.2.3 Status der Lymphknotenmetastasierung cNO und cN+ | 38 |
| 4.2.4 Cisplatindosis | 40 |
| 4.2.5 Tumorlokalisierung | 41 |
| 4.2.6 Überlebensanalyse für das Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben nur für Oropharynxkarzinome betrachtet. | 43 |
| 4.3 Ergebnisse der Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung | 45 |
| 4.3.1 Immunfluoreszenzfärbung | 45 |
| 4.3.2 Statistische Auswertung der Immunfluoreszenz | 53 |
| 5 Diskussion | 55 |
| 5.1 Diskussion der Methodik | 55 |
| 5.1.1 Diskussion der Multiplex-Immunhistochemie-Methode | 55 |
| 5.1.2 QuPath..... | 56 |
| 5.2 Diskussion der Ergebnisse..... | 58 |
| 5.2.1 Diskussion der deskriptiven Statistik | 58 |
| 5.2.2 Diskussion der Überlebensanalysen | 60 |
| 6 Zusammenfassung | 64 |
| 7 Literaturverzeichnis..... | 66 |
| 8 Danksagung..... | 73 |
| 9 Tabellarischer Lebenslauf..... | 74 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|--------------|---|----|
| Abbildung 1 | Ergebnis der Überlebensanalyse Rauchen unter Therapie. | 39 |
| Abbildung 2 | Ergebnis der Überlebensanalyse Alkohol unter Therapie. | 40 |
| Abbildung 3 | Status der Lymphknotenmetastasierung cN0 vs cN+. | 41 |
| Abbildung 4 | Überlebensanalyse Cisplatinosis | 42 |
| Abbildung 5 | Überlebensanalyse Tumorlokalisierung | 43 |
| Abbildung 6 | Überlebensanalyse Tumorlokalisierung Hypo- u. Oropharynx. | 44 |
| Abbildung 7 | Ergebnisse Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung IF129_VI92 | 41 |
| Abbildung 8 | Ergebnisse Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung IF125_VI47 | 42 |
| Abbildung 8 | Ergebnisse Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung IF125_VI47 | 43 |
| Abbildung 9 | Ergebnisse Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung IF129_VI89 | 44 |
| Abbildung 10 | Ergebnisse Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung IF129_VI88 | 45 |
| Abbildung 10 | Ergebnisse Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung IF129_VI88 | 46 |
| Abbildung 11 | Ergebnisse Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung IF131_VII20 | 47 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabelle 1 | Einteilung HPV-assoziiertes OPSCC in der TNM-Klassifikation | 7 |
| Tabelle 2 | Ergebnisse Deskriptive Statistik: Patientencharakteristika | 33 |
| Tabelle 3 | Ergebnisse Deskriptive Statistik: Tumorcharakteristika | 35 |
| Tabelle 4 | Ergebnisse Deskriptive Statistik: Therapiedetails | 36 |
| Tabelle 5 | Ergebnisse Deskriptive Statistik: Immunfluoreszenz | 38 |

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Die Tumoren der Kopf-Hals-Region sind primäre, meist epitheliale Malignome die im oberen Aerodigestivtrakt entstehen. In Inzidenzen werden regionale und geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet (1). Dies erklärt sich durch ätiologische Risikofaktoren der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (kurz: HNSCC für Head an Neck Squamous Cell Carcinoma), wozu unter anderem regelmäßiger Alkohol- und Tabakkonsum zählen. Der Verzehr von Areca-Nüssen (Betelnüssen), Mate sowie das Kauen von Khat-Blättern tragen im süd-ostasiatischen Raum ebenfalls zur Tumorentstehung bei (2). Als ein weiterer Faktor der Karzinogenese insbesondere für Oropharynx-Karzinome zählt des Weiteren die Humanes-Papilloma- Virus Infektion (HPV)-Infektion, welche über einen komplexen stufenförmigen Prozess zur Veränderung des genetischen Merkmale führen kann (3). Aufgrund von Risikofaktoren erkranken Männer circa viermal häufiger an HNSCC als Frauen.

Das mittlere Erkrankungsalter lag 2013 bei 66 Jahren für Frauen und 67 Jahren für Männer. Die Erkrankungs- und Sterberate in Deutschland verglichen seit Ende der 1990er Jahre nimmt für Männer ab, für Frauen bleibt die Rate nahezu unverändert (4). Insgesamt machten die Kopf-Hals-Karzinome weltweit im Jahr 2018 circa 4,9 % aller neu aufgetretenen Krebserkrankung aus und bei den Todesfällen betrug der Anteil an allen an Krebs verstorbenen Menschen 4,8 % (5). Die aktuelle Therapie des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich besteht aus der chirurgischen Resektion des Tumors mit anschließender Rekonstruktion sowie risikoadaptiert einer adjuvanten Radio- oder Radiochemotherapie. Eine primäre Radio-Chemotherapie kann ebenfalls in kurativer Absicht durchgeführt werden. Rein medikamentöse Therapieregime werden nur in nicht heilbaren Stadien des Tumors eingesetzt und beinhalten häufig eine platinbasierte Chemotherapie mit oder ohne Immuncheckpoint-Inhibitoren (6). Durch das schnelle Wachstum neoplastischer Zellen wird die Neovaskularisation häufig nicht genügend unterstützt, weswegen maligne Tumore meist hypoxische Gewebereiche aufweisen, was bei der weiteren Behandlung berücksichtigt werden sollte (7, 8).

Hatfield et al (9) konnten in einer richtungsweisenden Studie eine Hypoxie vermittelte Immunsuppression zeigen.

In dieser Studie wurde anhand eines Mausmodells gezeigt, dass inspiratorische Hyperoxie zu einer verstärkten Immunzelleninfiltration innerhalb des Tumors führt. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese der Hypoxie-vermittelten-Immunsuppression. Ein möglicher Mechanismus dieser Immunsuppression ist dabei wie folgt:

Bei einer Hypoxie wird durch den Hypoxie-induzierten-Faktor-1-alpha (HIF-1- α) eine Überexpression der Ektonucleotidasen CD39 und CD73 induziert. Dies katalysiert die Umwandlung von ATP in Adenosin. CD73 beschleunigt den entscheidenden Schritt der Umwandlung von AMP in das vasodilatierend wirkende Adenosin, wodurch wahrscheinlich die Gewebedurchblutung und die Sauerstoffversorgung verbessert wird (9). Das im Extrazellularraum überexprimierte Adenosin reguliert insbesondere durch den A2a-Rezeptor eine Hemmung der zytotoxischen T-Lymphozyten.

Die Multiplex-Immunfluoreszenzmethode ist eine etablierte und effektive Technik um unterschiedliche Immunzellen und Gewebeverhältnisse (Hypoxie) simultan in einem Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Gewebe nachzuweisen. Die dabei verwendeten spezifischen Fluorophor- oder Enzymreporter-markierten Antikörper ermöglichen die gleichzeitige Detektion von mehreren Proteinexpressionsmustern (10).

Die Motivation zur Erstellung dieser Dissertation war die Erkenntnis, dass die aktuelle Therapie noch nicht optimal ist, um bei den Patienten eine Heilung zu erreichen. Leider treten immer noch viele Tumorrezidive auf. Das Hauptziel dieser Doktorarbeit bestand darin, die Zusammenhänge einer anti-tumoralen Immunaktivität mit dem Überleben nach primärer Radiochemotherapie von Kopf-Hals-Tumoren – mit Ausnahme der Nasopharynx-Karzinomen- zu untersuchen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Grundlagen und epidemiologische Kennzahlen für bösartige Tumore der Kopf-Hals-Region

Der „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 „ des Robert-Koch-Instituts prognostizierte für die Folgejahre eine stete Zunahme der Morbidität und Mortalität von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland (11). Es wurde vermutet, dass die Inzidenz bei Männern von 5500 auf 14.300 Todesfälle und bei Frauen von 1700 auf 5500 Todesfälle bis zum Jahr 2020 ansteigen würde. Die Sterblichkeit bei den unter 60-jährigen ist seit Ende der 1990er Jahre in den neuen Bundesländern signifikant gestiegen, mit einem Ost-West-Deutschland-Gefälle. Möglicherweise spielt dabei auch die regional unterschiedliche Entwicklung des Tabak- und Alkoholkonsums eine Rolle. In den letzten Jahren wurde tatsächlich eine Zunahme der Inzidenz maligner Tumoren der Mundhöhle und des angrenzenden Rachenraums verzeichnet. Bei Männern zeigt sich eine rückläufige, altersspezifisch normierte Tumorzinzenz im unteren Pharynx und Larynx, während sie bei Frauen stabil bleibt.

2.2 Tumorinduktion durch HPV und erhöhte Radio-Chemosensibilität von HPV-positiven HNSCC sowie spezielle WHO-Klassifikation

Zusätzlich zu den Hauptrisikofaktoren wie Rauchen und Alkoholkonsum kann bei einem Teil der Kopf-Hals-Tumoren auch eine HPV-Infektion vorliegen. Bei der HPV-assoziierten Tumorentstehung findet eine Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom statt, im Gegensatz zum episomalen HPV-Genom, welches bei einer Akutinfektion vorliegt (12). Diese Virusgenomintegration verschafft dem Virus einen Proliferationsvorteil für die Karzinogenese (13). Häufig kommt es bei der Integration zu einem Verlust der Gene E2 und E5. Auch das E2-Gen kann Deletionen aufweisen (14, 15). Möglicherweise existiert eine aktive Expression des E2-Proteins in Tumoren der Kopf-Hals-Region (16, 17).

Die humanen Papillomaviren im genitalen und im Kopf-Hals-Bereich besitzen Protoonkogene, die die Zell-Proliferation stimulieren und hochregulieren (18, 19). Zu Ihnen gehören über 100 verschiedene Typen mit unterschiedlichen Risikogruppen, darunter exemplarisch die „high-Risk Types“ HPV 16, 18, 31 und 33 die für die Entstehung von Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma (OPSCC) und Zervixkarzinomen verantwortlich gemacht werden. Diese High-Risk-Subtypen können Karzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC), insbesondere im Oropharynx auslösen (20). Die Studienlage belegt die erhöhte Inzidenz der HPV-assoziierten Entstehung von HNSCC (21, 22). Bei den HPV-positiven OPSCC-Erkrankungen werden häufig ein geringer Alkohol- und Tabakkonsum beschrieben (23, 24).

HPV infiziert das Oropharyngealepithel. Im Falle einer ausbleibenden Elimination durch das körpereigene Immunsystem kann das persistierende Virus zu einer neoplastischen Transformation von Epithelzellen führen (25). Eine Folge ist die Dysregulation sowie Instabilität des Genoms durch die Onkoproteine E6 und E7, die p53 und das Retinoblastom-Protein (pRB) deaktivieren oder supprimieren können (3, 26, 27). Eine E6 induzierte Inaktivierung des Tumorsuppressorgens-p53 begünstigt vermehrte DNA-Schäden, was zu einer Verlangsamung des Zellzyklus sowie zur fehlenden Einleitung von Reparaturmechanismen und Apoptosevorgängen führt.

Eine Deletion des Tumorsuppressorgenes p53 führt dazu, dass das HPV-E7-Protein an das pRB bindet, wodurch der Übergang der G1- zur S-Phase nicht mehr kontrolliert werden kann, da pRB übermäßig abgebaut wird. In der Folge wird der E2f-Transkriptionsfaktor aktiviert und der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p16INK4A überexprimiert, was den Wiedereintritt in die S-Phase des Zellzyklus bewirkt. Es folgt eine Ubiquitylierung und ein Proteasomabbau von p53, da die Apoptoseinduktion durch den ungeplanten S-Phasen-Eintritt verhindert wird. Bei DNA-Schädigungen benötigt die Zelle p21 zur Aktivierung von p53, um den Cyclin-CDK (kurz für: Cyclin-Dependent-Kinase) -Komplex zu inhibieren, der eigentlich den Übergang der G1-Phase in die S-Phase vermittelt, und um eine unkontrollierte Zellteilung zu verhindern.

Basierend auf dem HPV-Status werden prognostisch bedeutsame Subtypen der Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses in der vierten Auflage der WHO-Klassifikation unterschieden und in verukköse, basaloide, sarkomatoide und „konventionelle“ Karzinome unterteilt. Letztere werden nach Ähnlichkeit mit normalen Plattenepithelkarzinomen in G1-G3 klassifiziert. Ein besonderes Augenmerk ist dem Oropharynxkarzinom gewidmet – da bei jedem Patienten ein HPV-Test und eine immunhistochemische Expressionsanalyse des p16-Proteins im Biopsat durchgeführt werden. Ein positives Tumorergebnis liegt bei mehr als 70% der HPV positiven nukleär und/oder cytoplasmatischer p16 exprimierenden Tumorzellen vor. HPV-assoziierte HNSCC werden aufgrund der natürlichen Fragmentierung der Basalmembran im lymphoepithelialen Gewebe nicht klassifiziert. Es gibt bei diesen Karzinomen keine Vorläuferläsionen (Carcinoma in situ). Diese Tumore werden immer als invasiv eingestuft.

2.3 Einteilung HPV-assoziiertes OPSCC in der TNM-Klassifikation

In der aktuellen TNM-Klassifikation von 2017 wird der immunhistochemische Nachweis von überexprimiertem p16 als Surrogatmarker für HPV – assoziiertes OPSCC verwendet.

| Risikogruppe | Niedriges Risiko | Mittleres Risiko | Hohes Risiko |
|--------------------------|------------------|------------------|--------------|
| HPV-Status | Positiv | Positiv | Positiv |
| TNM-Status | N0-N2A | N2B-N3/T2-T3 | T4 |
| 3-Jahres-Gesamtüberleben | 93 % | 70,8% | 46,2% |
| Nikotinkonsum | <10 / >10 | >10 / <10 | <10 / >10 |

Tabelle 1 Die Risikogruppen gemäß Ang et al werden basierend auf dem HPV- Status, dem Tabakkonsum und der TNM-Klassifikation in ein 3-Jahresgesamtüberleben eingeteilt (28).

Dabei kommen folgende relevante Parameter zur Berücksichtigung:

Die Tumorgöße (pT1-4) mit zusätzlicher Angabe der Tiefeninvasion bei oralen HNSCC. Der Nodalstatus (N) bei Oropharynxkarzinomen wird zwischen p16-negativen und p16-positiven Tumoren differenziert.

Nodalstatus für alle Kopf-Hals-Karzinome und p16-negative Oropharynxkarzinome (pN1-3) mit Angabe der Anzahl der resezierten und befallenen Lymphknoten und deren Lage. Angaben zur Größe der größten Metastase und zur extrakapsulären Infiltration (ECE) sollten ebenfalls gemacht werden.

Nodalstatus (pN1-pN2) für HPV-16 negative Oropharynxkarzinome, bei denen nur die Anzahl der befallenen Lymphknoten - pN1: bis zu 4 Lymphknoten oder pN2: 5 Lymphknoten oder mehr relevant ist, nicht aber die Größe oder die extrakapsuläre Infiltration. Es ist zu beachten, dass die aktuelle TNM-Klassifikation p16-negative und p16- positive HNSCC als separate Entitäten in unterschiedlichen Systemen klassifiziert.

Zu den obligatorischen Parametern wird eine Bewertung des Wachstumsmusters des Karzinoms empfohlen. Der prognostische Wert des „Tumorbuddings“ (TB, Tumorknospung) wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen. Das Tumorbudding ist definiert als das Vorhandensein von isolierten kleinen Clustern von Tumorzellen bis hin zu einzelnen Zellen außerhalb des Tumors und kann als fehlend, schwach oder stark angegeben werden (29). Hohe Intensität eines Tumorbuddings ist ein Zeichen aggressiveren und zunehmend malignem Potenzials von HNSCC, die vermehrt cervikale Lymphknotenmetastasen aufweisen (30, 31). Zu beachten ist, dass das „CUP-Karzinom“ (kurz für: Cancer of Unknown Primary - „Krebs mit unbekanntem Ursprung“) bei dem kein Primärtumor nachgewiesen werden kann, eine besondere Situation darstellt. Hier werden leitliniengerecht zur Einstufung die p16-Immunhistochemie und die EBV-in-situ-Hybridisierung empfohlen.

Eine positive Reaktion kann auf ein kleines HPV-assoziiertes OPSCC oder ein EBV-assoziiertes Nasopharynxkarzinom als primäres Karzinom hinweisen. Falls trotz zusätzlicher Untersuchungen kein Primärtumor gefunden werden kann, werden CUP-Patienten in der aktuellen UICC/TNM-Klassifikation einem eigenständigen Klassifikationsschema zugeordnet.

In fortgeschrittenen, rezidierten- oder metastasierten Stadien wird des Weiteren empfohlen den PD-L1-Expressionsstatus ebenfalls immunhistochemisch zu bestimmen.

2.4 Prognostische Faktoren bei der Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (HNSCC)

In einer Analyse von 86 nationalen Krebsdatenbanken für Karzinompatienten mit Erstdiagnose von 1999 bis 2007 hat die EURO CARE-5-Studie 5-Jahres-Überlebensraten durch eine altersstandardisierte Datenerhebung und in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation ermittelt (32).

Im Einzelnen sah das Ergebnis folgendermaßen aus:

Die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate bei Tumoren im Hypopharynx betrug 25%, in der Larynxregion 59%, des Weiteren im Oropharynx 39%, in der Mundhöhle 45%, auf der Zunge 43% und im Nasopharynx 49%. Vergleichbare Resultate wurden in einer Datenerhebung im Raum Thüringen erzielt (33).

Eine Vielzahl von begünstigenden Faktoren bestimmen die Tumorprognose (34). Unter anderem sind die Tumorgöße sowie der lokoregionär befallene Lymphknotenstatus maßgebend für den Krankheitsverlauf. Diese sind neben der Qualität der chirurgischen Tumorresektion prognostisch relevant und maßgeblich für die weitere Therapieplanung (35-37)

Patienten, die im ECOG- oder Karnofsky-Index mit einem schlechten Allgemeinzustand eingestuft sind und meist Komorbiditäten aufweisen, zeigen einen komplizierten und tendenziell einen ungünstigen Therapieverlauf (38). Des Weiteren belegen Untersuchungen die deutlich bessere Prognose, bei HPV-positiven Oropharynxkarzinomen im Vergleich zu den HPV-negativen (28). Allerdings gilt diese Prognoserelevanz nicht bei anderen Tumoren der Kopf-Hals-Region, die ebenfalls durch HPV-Infektionen verursacht sein können (39-42). Weitere relevante Faktoren für den Therapieverlauf und das Überleben sind neben der Lokalisation auch Geschlecht, Raucher-, Alkohol – und Sozialstatus (43).

Auch molekulardiagnostische Marker sind entscheidend bei der Prognose, ein Beispiel ist der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), dessen Expression die Angiogenese fördert und dadurch das Sterberisiko verdoppelt (44).

2.5 Tumorhypoxie

Tumorhypoxie führt zu erhöhter Aggressivität und Resistenz von Tumorzellen, was mit einem fortgeschrittenen Verlauf und einer ungünstigen Prognose bzw. erschwertem Therapieverlauf verbunden ist.

Ursachen dafür können z.B. eine abnorme Gefäßbildung, schlechte Versorgung mit Sauerstoff oder eine gesteigerte Zellteilung, mit Folge eines höheren Sauerstoffbedarfs der malignen Zellen sein.

Gezielte Therapieansätze, die auf eine Optimierung der Tumoroxygenierung abzielen, verbunden mit der Kontrollierbarkeit von Tumorwachstum und – Aggressivität, könnten zu einer günstigeren Prognose für Tumorpatienten führen und Gegenstand aktueller Forschung (8, 45, 46). Die wichtigsten Hauptmechanismen einer Tumorhypoxie werden im Artikel von Vaupel et al erläutert (47). Sie legten dar, wie die Anomalien der Struktur der tumorversorgenden Blutgefäße zu einer Sauerstoffminderversorgung und einer insuffizienten Perfusion des Tumors führend kann, was zur Entstehung von hypoxischen Arealen beiträgt. Dadurch wird die Diffusionszeit verlängert und die Oxygenierung in den Tumorzellaggregaten limitiert. Durch Hemmung der Bildung und Freisetzung von roten Blutkörperchen durch Tumorzellen, kommt es zu einer Anämie, die ebenfalls die Tumorhypoxie fördert. Die hypoxischen Bedingungen werden durch diese Mechanismen, die einzeln oder in Kombination auftreten können, erzeugt (Anämie versus verminderter Sauerstofftransport in den Zellen). Um zu überleben entwickeln Tumorzellen als Antwort auf die Hypoxie unterschiedliche Anpassungsmechanismen. Dieser neu angepasste Zustand kann wiederum das Tumorwachstum und - Aggressivität und die Therapieresistenz beeinflussen (48, 49). Die Blutgefäße, die im Tumorgewebe wachsen, unterscheiden sich stark von gesunden Blutgefäßen. Das liegt daran, dass die Tumor-Blutgefäße mit unregelmäßigen Verzweigungen und irregulären Verteilungsmuster ein komplexes Wachstum aufweisen, im Gegensatz zur geordneten Hierarchie gesunder Blutgefäße mit gleichmäßiger Anordnung von Arterien, Arteriolen und Kapillaren. Weitere Abnormalität von Blutgefäßen sind arterio-venöse Shunt-Malformationen oder sogar auch fehlende Gefäßverbindungen sowie mikroskopisch strukturelle Unterschiede (47-50).

Das Oberflächenprotein Endoglin (CD105) wird vor allem auf Endothelzellen exprimiert und spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Integrität von Blutgefäßen sowie in der Blutdruckregulation und Wundheilung.

Das Expressionsmuster von Endoglin kann verändert sein, was sich auf die Tumorangiogenese auswirken kann. Dies führt zur Neubildung von tumorversorgenden Blutgefäßen und zur Ausbildung abnormer Gefäßstrukturen, wie z.B. fehlende Basalmembran mit daraus resultierender Minderversorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff (51, 52).

Die abnorme Struktur der Tumorgefäße beeinträchtigt deren Funktion. Einige dieser Gefäße werden lediglich von Plasma durchströmt, da sie zu eng für rote Blutkörperchen sind, welches auch einer diskontinuierlichen Durchblutung aufgrund des veränderten Blutflusses führen kann (48). Strukturelle Anomalien des Endothels mit erhöhter Permeabilität und abnormalem Druck im umgebenden Gewebe führen zu einer Tumorgefäßkompression und eingeschränkter Perfusion des Tumorgewebes (50). Die unregelmäßige Verteilung der Gefäße im Gewebe führt zu erheblich verlängerten Diffusionsdistanzen. Einige Tumorzellen befinden sich in über 70 µm Entfernung von einem Kapillargefäß. Vaupel et al. weisen in ihrem oben erwähnten Review von 2004 darauf hin, dass diese Distanz eine kritische Grenze für die Aufrechterhaltung eines normalen Mikromilieus darstellt (47, 53). Die Konsequenz dieser erheblichen Distanz ist nicht nur eine reduzierte Sauerstoffversorgung und die Entstehung von Gewebhypoxie, sondern auch ein Mangel an anderen Nährstoffen wie Glukose sowie ein unzureichender Abtransport von Stoffwechselprodukten (47).

Zusätzlich zur Verteilung der Kapillaren trägt die Struktur einiger dieser Blutgefäße zur Verschärfung der Diffusionshemmung bei. Besonders bedeutsam sind dabei die sogenannten "Haarnadel"-Kapillaren, die als längliche Strukturen eine 180°-Wendung an der Spitze aufweisen und dadurch den ein- und ausfließenden Teil des Gefäßes nahe beieinander positionieren (54, 55). Dies erzeugt einen Längs-Diffusionsgradienten, ähnlich dem Gegenstromprinzip in der Niere. Interessanterweise zeigen Zellen am Ende dieser Kapillaren, trotz direkter Anbindung an das Kapillargefäß und einer nur geringen Distanz von Mikrometern, Hypoxie-Charakteristika wie die Expression von Carbonic Anhydrase IX (CA IX) (53).

Die durch die Beschränkung von Blutversorgung und -diffusion hervorgerufene Hypoxie wird zusätzlich durch die tumorinduzierte Anämie verstärkt, einerseits die mit dem Tumor selbst in Verbindung stehende und andererseits die Anämie die als Therapiefolge auftritt (47). Da über 40% der Tumorfälle vor Therapiebeginn eine Anämie aufweisen und insbesondere nach zytostatischer Therapie über 90% der Patienten unter Anämie leiden, ist dies ein bedeutendes Problem (56). Die Mechanismen der Anämieentwicklung bei Tumorpatienten, die den Blutfluss beeinträchtigen können, umfassen Knochenmarknekrosen durch Tumormetastasen, mechanische Hämolyse oder auch chronischen Blutverlust (57).

Die erhöhte Zytokinausschüttung hemmt die renale und zelluläre Erythropoetinproduktion (57, 58). Ein weiterer Grund ist der erhöhte Metabolismus des Tumors mit hohem Energiebedarf sowie auch ossäre Metastasierungen oder Karzinosen, die ebenfalls eine Anämie begünstigen können (58, 59).

Diese Veränderung der Eisenstoffwechsellage war insbesondere in der Akutphase verstärkt (60). Als mögliche Auswirkungen lassen sich zwei Hauptmechanismen ursächlich für die Tumorphoxie unterscheiden: Einerseits wirkt die Tumorphoxie auf das intrinsische Tumorverhalten, andererseits hat sie auch Auswirkungen auf die extrinsische Behandlung, wie z.B. Strahlen- oder Chemotherapie (47, 60). Die Entstehung eines hypoxischen Tumormikromilieus führt zu Anpassungen und auch Modifikationen innerhalb des Tumors und des Proteoms, wie z.B. inhibierende oder entdifferenzierende Wirkungen. Die oben dargestellten Veränderungen manifestieren sich in einer Vielzahl von Erscheinungen, wie z.B. späteren Rezidiven, inaktiven Mikrometastasen oder einer Reduktion der Tumorprogressionsrate bei größeren Tumoren (7). Die resultierende Veränderung des Tumormikromilieus kann ihrerseits zu einem schwerwiegenden klinischen Bild führen, indem vor allem diejenigen überleben und sich vermehren, die trotz herausfordernder Bedingungen und Nährstoffdefizite lebensfähig sind (61-63). Das aktive Fluchtbestreben der Tumorzellen aus der ungünstigen Umgebung erhöht die Tumoraggressivität (64). Unter Hypoxie entwickeln Karzinome eher lokal invasive Wachstumsmuster und breiten sich vermehrt in die Umgebung aus, um dann lokal invasiv infiltrierend zu wachsen (65), was zu einer höheren Anzahl regionaler - und Fernmetastasen führt (66-69).

Als Reaktion auf den Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen verlangsamen Tumorzellen ihren Stoffwechsel und reduzieren ihre Zellteilung. Die Hypoxie bedingte Verringerung der Zellteilungsrate erklärt auch die erhöhte Resistenz von Tumorzellen gegenüber therapeutischen Ansätzen, die auf die Zellteilung abzielen. Dies kann sich negativ auf die Wirksamkeit zytostatischer Therapien auswirken in Form einer erhöhten Strahlenresistenz auswirken (7, 70, 71). Bei normalem mit Sauerstoff versorgtem Gewebe führen Röntgenstrahlen durch freie Radikale zu DNA-Schäden – meist ohne Reparatur dieser Schäden. DNA-Schäden durch freie Radikale im hypoxischen Zustand besitzen hingegen eine unterschiedliche chemische Struktur welche eine Reparatur zulässt –Strahlenschäden werden also in Präsenz von Sauerstoff „fixiert“ (72, 73). Da diese „Sauerstoff-Fixierung“ in hypoxischem Gewebe fehlt, werden höhere Strahlendosen für vergleichbare Effekte wie bei Tumoren die unter normalen Bedingungen mit Sauerstoff versorgt werden benötigt.

Mit anderen Worten: Strahlenschäden werden unter hypoxischen Bedingungen nicht fixiert, d.h. in Abwesenheit von Sauerstoff können erfolgreich -diese Schäden repariert werden, dies führt zu einer erhöhten Strahlenresistenz des Tumorgewebes, sodass höhere Strahlendosen erforderlich sind.

Zur Erzielung der gleichen Wirkung bei Tumoren mit Hypoxie oder Anoxie versus normoxischer Tumoren ist es möglich, die Strahlendosis um den Faktor zwölf zu erhöhen (73, 74) (75). Um den hypoxischen und anspruchsvollen Bedingungen entgegenzuwirken werden von den Tumorzellen gesteigert verschiedene Proteine gebildet, zum Beispiel Glutathion und Hitzeschockproteine.

Diese Moleküle tragen ebenfalls zur Tumor-Strahlenresistenz bei, allerdings auf unterschiedliche Weise. Glutathion wirkt als Radikalfänger und kann eher mit Alkylantien als mit DNA reagieren (71, 76). Hitzeschock-Proteine wie beispielsweise Hsp70 werden auch mit einer erhöhten Strahlenresistenz in Verbindung gebracht (77-80) . In ähnlicher Weise findet, wie zuvor beschrieben, eine Selektion von Zellen mit verringertem Potenzial für den programmierten Zelltod statt, was ihre Resistenz gegenüber Strahlenschäden erhöht (78).

Zudem entstehen hypoxische Regionen hauptsächlich aufgrund eingeschränkter Durchblutung und Diffusion. Deswegen erreicht die systemische Chemotherapie in diesen Bereichen oft nicht die erforderliche Konzentration, verdeutlicht am Beispiel mit Cisplatin (81, 82) (83)

2.6 Carboanhydrase IX

Regulationsmechanismen der Carboanhydrase IX sind transkriptionelle und posttranslationale Genregulationsmechanismen, zum Beispiel auf wechselnde Milieueigenschaften darunter auch Hypoxie. Es existiert eine spezielle DNA-Sequenz, das sogenannte Hypoxie-responsive-Element (HRE) in der Promotorregion des CA-IX-Gens und kodiert für CA – IX und ist zuständig unter hypoxischen Bedingungen das Regulatorprotein HIF-1- α (kurz für: Hypoxia-inducible-Faktor 1-alpha) an das HRE zu binden und somit eine erhöhte Expression des CA-IX-Gens – korrelierend auch eine Hochregulation der Expression von CA-IX in der Zelle zu induzieren (84).

In diesem Fall erfolgt die Regulation durch Enzyme, die als Metalloproteinasen bekannt sind. Diese Enzyme sind in der Lage, die äußere Domäne von CA IX abzuspalten. Dies kann die Aktivität oder Stabilität von CA IX beeinflussen und somit seine Funktion in der Zelle modulieren (85). Interessanterweise reagiert CA IX anders auf bestimmte Hemmfaktoren im Vergleich zu anderen Carboanhydrase-Isoenzymen. Zum Beispiel wird CA IX nicht durch hohe Konzentrationen von Laktat gehemmt, was sie von anderen Isoenzymen unterscheidet. Die CA IX-Konzentration kann auch durch Bikarbonat beeinflusst werden (86). Komplexe Regulationsprozesse der CA IX-Expression auf genetischer und posttranslationaler Ebene ermöglichen es der Tumorzelle, auf wechselnde Umweltbedingungen zu reagieren und gegebenenfalls, wenn erforderlich die Produktion von CA IX anzupassen, die z.B. als Schlüsselrolle zur pH-Wert Einstellung im hypoxischen Milieu fungiert.

Dies ist besonders in soliden Tumoren erforderlich. CA IX ermöglicht den Tumorzellen durch die Umwandlung von Kohlendioxid und Wasser in Bikarbonat und Protonen eine Anpassung an die raue und ungünstige Umgebung. Somit überleben und vermehren sich die Tumorzellen auch unter schwierigen Bedingungen – was bedeutet, dass eine erhöhte CA-IX-Expression entsprechend einer erhöhten Tumorphoxie eher prognostisch ungünstig ist und auch mit Therapieresistenzen verbunden sein kann.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

| <u>Gerät</u> | <u>Firma</u> | <u>Seriennummer</u> | <u>Modell</u> |
|-------------------|------------------------|---------------------|--|
| Thermomixer | Eppendorf | 535025873 | Compact |
| ph-Meter | Schott Instruments | 6110160 | Lab 850 |
| Feinwaage | Sartorius | ED124S-OCE | Extend |
| Waage | Ohaus | 8727143362 | Adventurer Pro AV2101 |
| Rührer | Heidolph | 119907925 | MR3000 |
| Mikrowelle | Bosch | | |
| Pipette | Eppendorf | 4855156 | research 1000 mikroliter |
| Pipette | Eppendorf | 1264836 | research 100 mikroliter |
| Pipette | Eppendorf | 4117065 | research 10 Mikroliter |
| Pipettenspitze | Tip One | S1111-6701 | 1000 Mikroliter blue graduated tip |
| Pipettenspitze | Tip One | S1111-0706 | 200 Mikroliter yellow tip |
| Pipettenspitze | Tip One | S1110-3700 | 10/20 Mikroliter XL graduated tip |
| Dunkelkammer | | | |
| Kimtech science | Kimberly-Clark | 7552 | Präzisionstücher |
| Nitril-Handschuhe | VWR | 112-2373 | L |
| Latex-Handschuhe | VWR | 112-2752 | L |
| Timer | Macherey-Nagel | 140277-006 | |
| Messflasche | Schott Duran | | 1000 ml |
| Wärmeschrank | Memmert (Schwabach) | 770633 | TV-40u |

| | | | |
|------------------------------------|----------------------------|------------|---------------------------|
| Messröhrchen | Greiner Bio-one | 188271 | Cellstar Tubes (15 ml) |
| Mikroreaktionsgefäße | Greiner Bio-one | 618201 | reaction tubes 1,5 ml |
| Gefrierschrank | Liebherr | 7083245-00 | |
| Alufolie | Carl-Roth GmbH + Co. KG | AAI 76.1 | |
| Deckgläser | Carl-Roth GmbH + Co. KG | H877 | 24 x 32 mm |
| Deckgläser | Carl-Roth GmbH + Co. KG | 1871 | 24 x 50 mm |
| Objektträger Thermo- Scientific | Menzel GmbH | 1800AMNZ | Superfrost Plus |
| Schüttler | Heidolph | | Polymax 1040 |

3.1.2 Chemikalien

| <u>Chemikalie</u> | <u>Firma</u> | <u>Best-Nr.</u> |
|--|-------------------------|------------------------|
| Ammoniumacetat, >97% p.a., ACS | Carl-Roth GmbH + Co. KG | 7869.2 |
| Aqua Dest. | Braun | 0082479E |
| AVS Titrimorph pH 4 | VWR Chemicals | 32095.264 |
| AVS Titrimorph pH 7 | VWR Chemicals | 32096.267 |
| AVS Titrimorph pH 9 | VWR Chemicals | 32039.261 |
| Citronensäure-Monohydrat, >99,5%, Ph. Eur. | Carl-Roth GmbH + Co. KG | 5110.1 |
| DAKO Antibody Diluent | DAKO North America Inc. | S0809 |
| DAKO Fluorescent Mounting Medium | DAKO North America Inc. | S3023 |
| Dulbecco Phosphate buffered Saline | Sigma-Aldrich | D8537 |
| EDTA >99% | Carl-Roth GmbH + Co. KG | CN06.2 |
| Kupfer-(II)-Sulfat, >98%, p.a., wasserfrei | Carl-Roth GmbH + Co. KG | P023.1 |
| NaCl | Serva | A30183 |
| NaCl >99,8% | Carl-Roth GmbH + Co. KG | 9265.2 |
| PBS Dulbecco ohne Mg/Ca | Biochrom GmbH, Berlin | L182-50 |
| SuperPicture HRP Polymer Conjugate Rabbit Primary | Life technologies | 879263 |
| SuperPicture Polymer Detection Kit | Life technologies | 879163 |
| Tris Pufferan, >99,9% p.a. | Carl-Roth GmbH + Co. KG | 4855.2 |
| Tris-HCl | Sigma-Aldrich | T3253 |

| | | |
|---|-------------------------|--------|
| Tris-Base | Sigma-Aldrich | T1503 |
| Tris-HCl, >99%, p.a. | Carl-Roth GmbH + Co. KG | 9090.3 |
| Tween 20 | Carl-Roth GmbH + Co. KG | 9127.1 |
| Wasserstoffperoxid, 30%, p.a., ISO, stabilisiert | Carl-Roth GmbH + Co. KG | 8070.2 |

3.1.3 Primär-Antikörper

Es wurden folgende Primär-Antikörper in der jeweils angegebenen Konzentration benutzt:

- Anti-Humanes CD73/NT5E mAb (Cell Signaling Technology, Kat.-Nr.: 13160, Klon: D7F9A, Spezies: Kaninchen, Konzentration: 1: 50)
- Anti-Humanes CA IX mAb (Abcam, Kat.-Nr.: ab108351, Klon: EPR4151[2], Spezies: Kaninchen, Konzentration: 1: 200)
- Anti-Humanes CD8 (DAKO, Kat.-Nr.: M7103, Klon: 144B, Spezies: Maus, Konzentration: 1: 800)

3.1.4 Fluorochrome

Zur Signalamplifikation wurden folgende Fluorochrome in der jeweils angegebenen Konzentration/Verdünnung eingesetzt:

- Cy3+ (PerkinElmer, Inc; Kat.-Nr.: NEL744001KT, Konzentration: 1: 50)
- Cy5+ (PerkinElmer, Inc; Kat.-Nr.: NEL745E001KT, Konzentration: 1: 50)
- FITC (Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr.: 46410, Konzentration: 1: 250)

3.1.5 Lösungen und Puffer

Vorbereitungen an Tag1:

Die Herstellung der 10 x PBS – Stammlösung erfolgte wie folgt: Abgewogen wurden 95,5 g Dulbeccos-PBS o Ca/Mg zum Lösen in 1000 ml Aqua Ecotainer®. Die Herstellung der 10 x TBS-T (Tris-Buffered Saline mit Tween-20) 0,1 %, mit einem pH 7,6 Stammlösung (= Waschpuffer) erfolgte wie folgt: Das Tris-HCl (MW 157,6 g/mol) wurde entsprechend für 1 Liter: 65,7 g oder für 0,75 Liter: 49,3 g abgewogen.

Das Tris-Base (MW 121,14 g/mol) wurde entsprechend für 1 Liter: 10,1 g oder für 0,75 Liter: 7,6 g abgewogen. Das Natriumchlorid (NaCl) (MW 58,44 g/mol) wurde entsprechend für 1 Liter: 175,3 g oder für 0,75 Liter: 131,5 g abgewogen.

Anschließend den 1 Liter-Ansatz auf 800 ml bzw. den 0,75 Liter-Ansatz auf 600 ml mit A. dest auffüllen und auf dem Rührgerät zu einem Homogenisat lösen.

Tween-20 (Stocklösung 10 Prozent) 10 ml (1-Liter-Ansatz) oder 7,5 ml (0,75 Liter-Ansatz) dazu pipettieren und unter ständigem Rühren homogene Lösung herstellen.

Nun erfolgt die Kontrolle und das Einstellen des pH-Wertes auf 7,6 mit Salzsäure (HCl) oder Natriumhydroxid (NaOH) um danach die Einwaage auf 1 Liter bzw. auf 0,75 Liter mit A. dest aufzufüllen. Die Lösung kann durch ein 0,22- μ m-Filter gefiltert werden.

Die so hergestellte gebrauchsfertige Lösung enthält nun eine Endkonzentration von 50 mM Tris-HCL (TrisBase), 300 mM NaCl und 0,1 Prozent Tween 20 (siehe CSA-Kit-Anleitung, RT-Lagerung). Die 10-fache TBS-T bzw. 10-fache PBS- Lösung wurde durch Verdünnen von 1 Teil Stammlösung in 9 Teilen destilliertem Wasser (Verdünnung 1:10) für die Verwendung gemischt.

Die Amplifikationspuffer-Lösung von Fa. Life Technologies sollte eine H₂O₂ - Endkonzentration von 0,0015 Prozent enthalten. Diese wurde mit 30-prozentiger H₂O₂ Wasserstoffperoxid (zur Analyse) in zwei Schritten frisch angesetzt, z.B. 1 μ l 30-prozentige Wasserstoffperoxid in 200 μ l Amplification-Buffer. Aus dieser Zwischenlösung erneut 10 μ l in 1000 μ l Amplification Buffer verdünnen, hiervon wurden 100 μ l pro Schnitt benötigt bzw. aufgetragen.

Die Endkonzentration des Wasserstoffperoxids beträgt 0,0015 Prozent.

Bei diesen mit Tyramid selbstgekoppelten Fluorochromen (TSA, z.B. Fa. ATTO) wurde nach extra Anleitung „Herstellung von Tyramid-Reagenzien“ und nur mit der Stocklösung C gearbeitet, dazu wurde Verdünnungsmedium (pH7,6) aus D-PBS (z.B. Biochrome ohne Ca/Mg) und 0,1 M Imidazol angesetzt.

Daraus wurde die Working-Solution frisch angesetzt mit 30-prozentigen H₂O₂ (p.A.) in zwei Schritten, z.B. 1 µl 30-prozentigen H₂O₂ in 200 µl Verdünnungsmedium. Im Anschluss wurde aus dieser Zwischenlösung erneut 10 µl in 1000 µl Verdünnungsmedium verdünnt, hiervon wurden ca 150- 200 µl pro Gewebeschnitt pipettiert.

Die Fluorochrome und Reagenzien werden in Plus-Puffer angesetzt, entsprechend:

1 g Dextransulfat, 20 ml D-PBS (1x) und 8 ml NaCl (5 M). Die Working-Solution wie bereits oben mit 30-prozentigen H₂O₂ (p.A.) mit einem Ansatz in zwei Schritten auf eine Endkonzentration von H₂O₂ (p.A.) auf 0,001 Prozent verdünnen. Der Ansatz der Stock-Solution der TSA-Plus-Palette Kits erfolgte mit jeweils 60 µl DMSO; der des TSA-Plus-Kits mit 150 µl DMSO und bei Alexa Stand alone auch ebenfalls mit 150 µl DMSO für den Ansatz benutzt. Aus dieser Stammlösung wurde in der Multiplex-Immunfluoreszenz-Färbung die Working-Solution hergestellt. Der Ansatz einer 10 mM Kupfersulfat (Ammoniumacetat) Lösung, pH5 erfolgte durch abwiegen von 1,93 g Ammoniumacetat auf 500 ml Aqua dest, mit 32-prozentigen HCL auf pH5 eingestellt, dazu wurden 1,25 g Kupfersulfat (CuSO₄) zugegeben und gelöst (Farbumschlag nach blau) und mit NaOH erneut der pH auf 5 eingestellt. 10 mg DAPI (4',6-Diaminidino-2-phenylindol) wurde in 2 ml Aqua dest gelöst (Haltbarkeit dieser Lösung bei -20°C im Dunkeln bis 6 Monate).

Tris-EDTA für die Antigendemaskierung

Tris Base (MW 121,14 g/mol) – 10 – mM entsprechend 1,21 g/l (0,6 g/500 ml)

EDTA (MW 292,25 g/mol) - 1 – mM 0,292 g/l (0,145 g/500 ml)

Zitratpuffer für die Antigendemaskierung

Gluc1

Für die Herstellung der Stammlösung A: (0,1 M Zitronensäure) wurden 21,01 g C₆H₈O₇ × H₂O in 1 Liter Aqua dest gelöst.

Für die Herstellung der Stammlösung B: (0,1 M Natriumcitrat) wurden 29,41 g $C_6H_5O_7 \times 2H_2O$ in 1 Liter Aqua dest gelöst (Stammlösungen bei 2-8°C im Kühlschrank aufbewahren).

Für den Ansatz der gebrauchsfertigen Lösung wurde folgend vorgegangen:

4,5 ml der Stammlösung A und 20,5 ml der Stammlösung B mit Aqua dest. wurden auf 250 mL aufgefüllt und der pH-Wert auf 6,0 mit Indikatorpapier eingestellt.

Peroxidase-Block

3,0- prozentige Wasserstoffperoxid in D-PBS wurde wie folgt angesetzt:

2 ml 30-prozentigen Wasserstoffperoxid plus 18 ml D-PBS wurden gemischt.

Tris-Puffer (oder ohne Tris-HCL)

1,8 g Tris-Base, 13,7 g Tris-HCl und 17,5 g NaCl (oder ohne Tris HCl) wurden abgewogen und in Aqua dest. angesetzt.

3.1.6 Gewebeentnahme und – aufbereitung

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gewebe stammen aus insgesamt 100 chirurgischen Resektionspräparaten von Tumoren der Kopf-Hals-Region vor Beginn einer primären Radiochemotherapie (Oropharynx, Hypopharynx, Larynx) aus der Biobank der Universitätsmedizin Mainz. Die Gewebeentnahme und -aufbereitung zu Paraffinschnitten erfolgten im Institut für Pathologie und die Immunfluoreszenzfärbungen im Labor der Radioonkologie und Strahlentherapie der Universtitätsmedizin Mainz. Nach der Gewebeentnahme wurde das Gewebe in 10-prozentigem Formalin fixiert (37 % Formaldehyd in Wasser).

Dies ermöglicht über einen Zeitraum von 12- 24 Stunden eine genügende Fixierung und bzw. Durchtränkung des Gewebes, bevor die weiteren Schritte, wie Auswaschen des Formaldehyds in Leitungswasser, aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90% und 100% Ethanol), Inkubation in Xylol und schließlich Einbetten in Paraffin folgen.

3.2 Methoden

3.2.1 Immunfluoreszenz

Die simultane Detektion multipler Proteine mit unterschiedlichen Fluorochromen auf einem Gewebeschnitt spart bei dem angewendeten Multiplex-Immunfluoreszenz-Färbungs- Kit Opal-3 von der Firma Akoya Biosciences Zeit und Probenmaterial. Des Weiteren stellt die Methode einen sehr guten Ansatz zur in situ Erforschung der Tumormikroumgebung dar um Expressionsmuster, Verteilung und Proteinaktivierung nachzuweisen. Im Kit enthalten sind Primärantikörper für die Zielproteine, Sekundärantikörper mit Oligonucleotid-Tags und die „Opal“-Farbstoffe mit Bindungsmöglichkeit an die Oligonukleotid-Tags. Ein weiterer Bestandteil des Kits ist ein Decodierungspuffer, welches zur Lösung der Opal-Farbstoff-Oligonukleotid-Tags-Bindung eingesetzt wird, um es zu ermöglichen somit weitere Farbstoffanwendungen zu markieren. Die Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgten nach einem für Paraffinschnitte etabliertem Färbeprotokoll (Protokoll 06/2011 Mayer). Die Färbung basiert auf einer indirekten Immunfluoreszenz, deren grundlegendes Vorgehen auf den Prinzipien von Toth und Mezey (2007) aufbaut. Hierbei werden gleichzeitig mehrere Antigene mittels Tyramid-konjugierter Antikörper (Tyramidsignalamplifikation, TSA) immunhistochemisch detektiert und bei wiederholtem Auftragen gleichzeitig auch das Signal verstärkt, mit dem Ergebnis der verbesserten Detektion.

Die Multiplex-Immunfluoreszenz-Methode beinhaltet zwei- bis drei aufeinanderfolgende Schritte über einen Zeitraum von mehreren Tagen.

Im Folgenden ein kurzer Überblick: Nach einer Entparaffinierung und Rehydrierung des Gewebeschnittes folgt die Blockierung, um unspezifische Bindungen zu unterdrücken. Die Primärantikörper sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert. In der Postinkubationsphase folgt die Sekundär-Antikörper-Inkubation mit Aktivierung des Fluorochroms und die abschließende Versiegelung des Gewebeschnittes zur Asservierung mit einem Schutzmittel. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung und Zellzählung mittels „QuPath“ ermöglichte die Expressionsanalyse der verschiedenen Antigene.

3.2.2 Schnitthanfertigung von Paraffingewebe mittels Mikrotom

Die Entparaffinierung des Gewebeschnitts beginnt im Wärmeschrank bei 60 °C für eine Stunde mit nachfolgend dreimaliger, je 10-minütiger Xylolreihe. Anschließend eine Inkubation je 5 Minuten eine absteigende Alkoholreihe - zuerst in 100-prozentigem, dann in 95- prozentigem Ethanol und 2 Minuten in 70-prozentigem Ethanol. Als nächster Schritt folgt zwei Minuten eine Inkubation mit Aqua dest und eine nachfolgende Spülung der Schnitte für zwei Minuten in TBS-T (1x).

3.2.3 Antigendemaskierung mittels Mikrowellenbehandlung

Die Mikrowellenbehandlung von Gewebeproben wird oft verwendet, um die Antigendemaskierung durchzuführen, mit dem Ziel, die Maskierung von Antigenen aufgrund von Formalinfixierung und Paraffinierung aufzuheben und somit die volle Immunreaktivität wiederherzustellen. Die Schnitte wurden in Citratpuffer bei pH 6,0 für viermal je 45 Sekunden bei 100-prozentiger Powerstufe bei 800 Watt bis es kocht erhitzt, anschließend für weitere 90 Sekunden weitergekocht. Dann wurden die Schnitte für weitere 15 Minuten bei einer 20- prozentigen Powerstufe bei 180 Watt gekocht. Der pH-Wert wurde kontrolliert (soll: pH=6,0) bevor die Objektträger für eine 35-minütige Abkühlphase bei Raumtemperatur gelagert wurden.

Die Gewebeschnitte wurden nun mit einem speziellen Fettstift für den Einsatz in der Immunhistochemie umrandet, welches durch die Erzeugung einer hydrophoben Barriere eine Reduktion der Antikörper- und Fluorchrommenge ermöglichte. Die fertig umrandeten Gewebeschnitte wurden in einer mit 1 x PBS-Puffer gefüllten Glaswanne gesammelt.

3.2.4 Autofluoreszenz

Nach dem zweimal für je 10 Minuten die Gewebeschnitte in 1x PBS dann anschließend einmal 5 Minuten in Aqua dest gewaschen wurden, folgte unter dem Abzug für 10 Minuten eine Inkubation der Gewebeschnitte in einer 10 millimolaren Kupfer (Ammoniumacetat)-Lösung, um die Autofluoreszenz des Gewebes soweit wie möglich zu unterdrücken. Es folgt die Abnahme und Entsorgung des Kupfers im Sondermüll. Um Überschüsse auszuwaschen und Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Schnitte dann einmal für 5 Minuten in Aqua dest, zweimal für je 10 Minuten in 1 x PBS und zuletzt einmal für 2 Minuten in TBS-T gewaschen, um im nächsten Schritt mit der Blockierung weiterzumachen.

3.2.5 Blockierung und Inkubation des Primär-Antikörpers anti- human CD7 (Kaninchen)

DAKO-AB-Diluent wurde während der Inkubation in Kupfer zur Autofluoreszenz-Unterdrückung bereits in Eppendorfgefäße aliquotiert und auf Raumtemperatur gebracht. Nach der Autofluoreszenz-Unterdrückung wurden 100 bis 150 µl pro Schnitt pipettiert und für 10 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur auf dem Gewebe inkubiert. Das DAKO-AB-Diluent enthält Pufferbestandteile, Salze und Proteine, um unspezifische Bindungen zu blockieren und eine spezifische Antikörperbindung zu fördern. Anschließend wurde ohne einen Waschgang durchzuführen vor Pipettierung des Primärantikörpers anti- human CD73 das Blocking-Medium auf ein Papierhandtuch abgekippt und einmal aufgeklopft auf das Papierhandtuch um überschüssiges Blocking-Medium zu entfernen.

Während der Abkühlphase nach der Mikrowellenbehandlung wurde der Kaninchen anti-human-CD73 Antikörper mit sterilem PBS in einer Verdünnung von 1:50 angesetzt und bei 27 °C vorgewärmt und nun 100 bis 150 µl pro Schnitt auf das Gewebe aufpipettiert. Die Inkubation der Schnitte betrug eine Stunde in einer Dunkelkammer mit feuchtem Milieu bei 28°C Raumtemperatur. Während der Inkubationszeit wurde der Tris-EDTA-Puffer mit einem pH-Wert mit vier normaler Natronlauge auf 9 eingestellt, außerdem der Sekundär-Antikörper anti-rabbit in kleineren Aliquots in Eppendorf-Tubes pipettiert. Anschließend wurde der Primärantikörper durch dreimaliges Waschen für 2 Minuten in TBS-T (1x) entfernt.

3.2.6 Sekundärantikörper

Danach wurde 100-150 µl des Anti-maus-Sekundärantikörper auf jeweils einen Gewebeschnitt pipettiert und für 10 Minuten inkubiert bevor die Schnitte erneut für dreimal 2 Minuten in TBS-T (1x) Waschpuffer gewaschen wurden.

3.2.7 Vorbereitung und Signalamplifikation des Fluorochroms

Während der Inkubation des Sekundärantikörpers wurde die Stocklösung des Fluorochroms Cy5+ mit einem sogenannten Amplifikations-Buffer 1:50 verdünnt.

Es wurden 150 µl pro Gewebeschnitt pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer inkubiert. Es folgte erneut ein Waschvorgang für dreimal 2 Minuten in TBS-T(1x) Waschpuffer. Danach folgte die modifizierte weitere Durchführung der erneuten Antigendemaskierung mittels Mikrowellenbehandlung.

Die folgenden Durchgänge der Antigendemaskierung wurden in einem Tris/EDTA-Puffer bei pH 9,0 durchgeführt. Anschließend erfolgte die Blockierung, gefolgt von der erneuten Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper.

Der Anti-Human-CD8 Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:50 bei 4°C über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Der CA IX Antikörper wurde wie oben beschrieben in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert (eine Stunde bei Raumtemperatur in feuchter Kammer). Bei dem Anti-Human-CD8 Antikörper handelt es sich um einen Mausantikörper. Hier war es notwendig einen Anti-Maus-Sekundärantikörper zu verwenden. Es erfolgte die Kopplung mit den Fluorochromen:

Maus-Anti-Human-CD8 wurde mit Cy3+ in einer Verdünnung von 1:50 im Amplifikations-Buffer gekoppelt

Kaninchen-Anti-Human CA IX wurde mit FITC in einer Verdünnung von 1:250 ebenfalls in Amplifikations-Buffer gekoppelt

3.2.8 DAPI-Kernfärbung und Eindecken der Schnitte

Nach der Durchführung des letzten Waschschrilles wurde die Zellkernfärbung mit DAPI in einer Verdünnung von 1:2000 in Aqua dest durchgeführt. Anschließend erfolgte die Aufpipettierung von je 100-150 µl dieser Lösung auf die Gewebeschnitte so dass die gesamte Gewebeoberfläche benetzt wurde. Die Inkubation wurde in der Dunkelkammer in feuchtem Milieu für 5 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten in PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Schnitte wurden anschließend mit einem Deckgläschen in ein „Ausbleichschutz“ enthaltene Fluoreszenzmontagemedium oder Mounting Medium eingedeckt. Bei diesem Vorgang wurde besonders darauf geachtet, dass keine Luftblasen eingeschlossen wurden und dies auch mikroskopisch nach dem Eindecken überprüft, damit die Bildqualität dadurch nicht beeinträchtigt wurde. Überschüssiges Eindeckmedium wurde mittels eines Papiertuches entfernt bevor das Deckglas mit einem Versiegelungslack auf die Ränder des Deckgläschens aufgetragen wurde, um die Austrocknung des Fluoreszenz Mediums zu verhindern und das Deckgläschen sicher auf dem Gewebeschnitt zu fixieren.

3.2.9 Bildaquisition des gesamten „Whole slide“ -Scan.

Die Immunfluoreszenz gefärbten Schnitte wurden mithilfe des Zeiss AxioScan.Z1 als „.CZI“ – Datei digitalisiert, es wurden angemessene „Single-Bandpassfiltersets“ für die Fluorochrome „DAPI“, „FITC“, „Cy3+“ und „Cy5+“ gewählt.

3.2.10 Datenanalyse mit QuPath

QuPath ist eine Open-Source-Software zur Analyse von Digital Pathology-Daten und wurde von Forschern an der University of Edinburgh entwickelt und ist auf GitHub verfügbar. Es bietet eine Vielzahl von Funktionen zur Bildanalyse, einschließlich Segmentierung von Gewebe, welche nach Integration von Machine-Learning-Tools zur automatischen Gewebe- und Zellklassifizierung eingesetzt werden kann. Um die Expression von CD73, CD8 und CA-IX mithilfe von QuPath zu analysieren wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach dem Importieren der Slide-Scans der Gewebeschnitte wurde zu Beginn zunächst eine visuelle Analyse auf Interaktionen zwischen den verschiedenen Populationen durchgeführt. Die Frage war, ob sich bestimmte Zellen einer Population gehäuft in räumlicher Nähe aufhalten (positive Interaktion) oder ob es eine inverse Korrelation bzgl. der Lage bestimmter Populationen zueinander gibt (negative Interaktion). Es wurde auch beurteilt, ob sich überhaupt keine Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellpopulationen finden lassen. Bei der anschließenden quantitativen Analyse wurde die Regions of Interest (ROI) durch manuelles Einzeichnen der relevanten Bereiche und das Definieren der Zelltypen zur automatischen Zellerkennung mittels Zellsegmentierungsalgorithmen mithilfe des DAPI-Signals festgelegt. Da jedes Präparat unterschiedlichen Behandlungen, wie z.B. unterschiedliche Fixierungs- und/oder Lagerungszeiten etc., ausgesetzt war, wurde das optimale Threshold-Muster für jedes einzelne Schnittpräparat in Bezug auf die Hintergrund- und der Zellkernintensität angepasst und detektiert. Dies ermöglichte die sogenannte „Single-Cell-Detektion“, bei der sämtliche Daten zu jeder einzelnen Zelle einzeln generiert und definiert wurden.

Darunter fallen die Koordinaten, die Fläche des Zellkernes, die Zellmorphologie mit Form von Kern und Zelle, die Fläche des Cytoplasmas, die Kern-Plasma-Relation, außerdem die Fluoreszenz Intensität jedes einzelnen in minimaler, maximaler und durchschnittlicher Intensität.

Die Antigen-Erkennung wurde durchgeführt, um die Zellen entsprechend einer Intensität oberhalb eines jeweiligen Grenzwertes als positiv für CD73, CD8 und CA IX zu klassifizieren. Ein Machine-Learning-Algorithmus basierend auf von „Random-Forest“-Klassifikatoren wurde für Tumor- und Stromazellen eingesetzt. Dieser wird auf einem zufälligen Unterdatensatz des Trainingsdatensatzes trainiert und verwendet nur eine Teilmenge der verfügbaren Merkmale.

Indem die Tumor- und Stromazellen basierend auf ihren CD73- und CA IX-Intensitäten in verschiedene Unterklassen eingeteilt wurden, konnte die Vielfalt und Robustheit des Modells gesteigert und gleichzeitig das Overfitting reduziert werden. Am Ende wurde jede Zelle einer von insgesamt neun Subpopulationen zugeordnet. Diese Unterteilung war wichtig, da CD8-positive Zellen grundsätzlich zwischen den "Tumor" - und "Stroma" -Kompartimenten wechseln können. Daher war es sinnvoll, diese Subpopulationen zu klassifizieren.

3.2.11 Visuelle Datenanalyse in QuPath

Insgesamt wurden 108 Immunfluoreszenz gefärbte Gewebeschnitte visuell in QuPath auf Plausibilität und Einheitlichkeit der Tumor-Stroma-Separation, hypoxische Zellen, CD8 Expression und CD73 Expression sorgfältig mit folgendem systematischen Vorgehen geprüft, um sicherzustellen, dass alle Marker regelrecht erkannt wurden.

Hierfür wurden jeweils fünf Gesichtsfelder pro Gewebeschnitt mit einer Vergrößerung von jeweils 10x visuell begutachtet und dabei auf grobe Defizite, Gewebequalität, die Identifikation der oben genannten Marker-Separation sowie auf unspezifische Färbungen oder Verunreinigungen, die die Interpretation beeinflussen könnten, geachtet.

Des Weiteren wurde auf Konsistenz und Repräsentativität überprüft, ob die zu erwartenden Eigenschaften der Marker dargestellt wurden. Folgende Parameter wurden erfasst:

Region of Interest vollständig, Region of Interest nur Tumor, Tumor-Stroma Zelldifferenzierung und – separation, Expression von CD8, Expression von CD73, Expression von FITC, die Zuordnung des Immunfluoreszenzpräparats zum Hämatoxyllin-Eosin-Präparat und abschließend die Bilddokumentation in optimal entsprechend nur vereinzelter exemplarisch falsch positiver Cluster bis 3 – 4 Zellen, des Weiteren in optimal/mittel; in mittel, in schwierig., in mittel-schlecht und schlecht ausgewertet.

Von den fünf Gesichtsfeldern wurden die repräsentativsten Ausschnitte jeweils in der Darstellung der Zellpopulationen entsprechend dem ersten Bild und „alle Fluoreszenzkanäle“ entsprechend dem zweiten Bild vom gleichen Ausschnitt in eine Power-Point-Datei dokumentiert. Wie bereits oben erwähnt, wurden so fünf repräsentative Gesichtsfelder in einer 10 x Vergrößerung visuell auf Plausibilität geprüft und dokumentiert.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Deskriptiven Statistik

4.1.1 Patientencharakteristika

| Charakteristika | N = 87¹ |
|------------------------------|---------------------------|
| Alter bei ED | 59 (52 - 67) |
| ECOG Performance Score | |
| 0 | 26 (49%) |
| 1 | 23 (43%) |
| 2 | 3 (5.7%) |
| 3 | 1 (1.9%) |
| Unbekannt | 34 |
| Nikotinkonsum | |
| Raucher | 62 (71%) |
| Nichtraucher | 25 (29%) |
| Nikotinkonsum unter Therapie | |
| Florider Nikotinabusus | 24 (29%) |
| Ex-Raucher | 58 (71%) |
| Unbekannt | 5 |
| Alkoholkonsum unter Therapie | |
| Florider Alkoholabusus | 12 (14%) |
| Kein Alkoholkonsum | 69 (79%) |
| Unbekannt | 6 (6.9%) |

¹Median (IQR); n (%)

Tabelle 2

Die Studie beinhaltete insgesamt 87 Patienten, davon 67 männliche. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 59 Jahre (Interquartilsabstand 52 bis 67 Jahre), was der Mehrheit der Patienten im mittleren Lebensalter entsprach, welches typisch für onkologische Patienten ist. Das Cut-off für das Follow-up war im Januar 2022. Das mediane 95 % - Konfidenzintervall (KI) der Nachbeobachtungszeit nach der Reverse-Kaplan-Meyer-Methode betrug etwa zehn Jahre (95% - KI 109-145 Monate) was einem langfristigen Follow-up entspricht, um solide Daten zur Langzeitwirksamkeit sowie Therapiesicherheit zu gewinnen. Dies bildet eine wertvolle Grundlage und hat entscheidende Bedeutung für fundierte Aussagen zu Langzeitüberlebensraten und zur Erhebung von Therapie- und Spätfolgen. Die Mehrheit der Patienten hatte einen ECOG-Status von Score 0 oder 1 – was einer guten bis moderaten körperlichen Verfassung entspricht. Bei 34 Patienten lagen keine Informationen zur Verfügung. Zum Zeitpunkt der Diagnose rauchte eine erhebliche Anzahl der Patienten; ein relevanter Anteil setzte das Rauchen während der Therapie fort. Zwölf Patienten hatten einen unter der Therapie fortgesetzten Alkoholabusus.

4.1.2 Tumorcharakteristika

| Charakteristika | N = 87 ¹ |
|-----------------------------|---------------------|
| Tumorlokalisation | |
| Hypopharynx | 20 (23%) |
| Larynx | 14 (16%) |
| Mundhöhle | 5 (5.7%) |
| Oropharynx | 48 (55%) |
| T-Stadium | |
| 1 | 2 (2.3%) |
| 2 | 13 (15%) |
| 3 | 29 (33%) |
| 4 | 43 (49%) |
| N-Stadium | |
| 0 | 14 (17%) |
| 1 | 5 (6.1%) |
| 2 | 61 (74%) |
| 3 | 2 (2.4%) |
| Metastasen (cM-Stadium) | |
| ja | 1 (1.3%) |
| nein | 74 (99%) |
| Grading | |
| 1 | 3 (3.4%) |
| 2 | 55 (63%) |
| 3 | 29 (33%) |
| Ort der Histologiegewinnung | |
| Primärtumor | 82 (94%) |
| Lymphknoten | 5 (5.7%) |

¹n (%)**Tabelle 3**

Der größte Anteil der entnommenen Gewebeproben stammt aus dem Primärtumor mit den häufigsten Tumorentitäten des Oropharynx-/Zungengrundkarzinoms bei 48 Patienten und des Hypopharynxkarzinoms bei 20 Patienten; 14 Patienten hatten ein Larynxkarzinom und fünf ein Mundhöhlenkarzinom. Bei insgesamt 72 Patienten befand sich der Tumor bereits im fortgeschrittenen TNM-Stadium (T3 und T4), und bei 62 Patienten lag zusätzlich auch ein fortgeschrittenes lymphogen metastasiertes Stadium mit N2 vor. Eine Fernmetastasierung vor Therapie wurde nur bei einem Patienten festgestellt.

4.1.3 Therapiedetails

| Characteristic | N = 87¹ |
|-----------------------------------|---------------------------|
| Simultane Systemtherapie | |
| Alleinige Radiotherapie | 17 (20%) |
| Cisplatin | 50 (57%) |
| Cisplatin/ 5-FU | 8 (9.2%) |
| Mitomycin/ 5-FU | 1 (1.1%) |
| Radioimmuntherapie nach Bonner | 7 (8.0%) |
| Wechsel Cisplatin auf Cetuximab | 4 (4.6%) |
| Dosis (Gy) | |
| < 70 Gy | 7 (8.0%) |
| 70+ Gy | 80 (92%) |
| Cisplatindosis | |
| keine simultane Cisplatintherapie | 25 (29%) |
| kumm. < 200 mg/m ² KOF | 14 (16%) |
| kumm. > 200 mg/m ² KOF | 48 (55%) |

¹n (%)

Tabelle 4

Bezüglich der Therapieansätze und der verabreichten Therapiedosis erhielten von 87 Patienten 79 Patienten eine Induktions-Chemotherapie, während 8 Patienten auf diese Therapie verzichteten.

Eine relativ hohe Anzahl von 42 Patienten, die eine Induktions-Chemotherapie erhielten, wurde nach dem TPF-Regime (Docetaxel, Cisplatin und 5-Fluoruracil „5-FU“) und 37 Patienten nach dem PF-Regime (Cisplatin und 5-Fluoruracil) behandelt. Bezüglich der erhaltenen Therapiedosis wurde einer signifikanten Mehrheit von 62 Patienten die volle Dosis verabreicht. Bei 17 Patienten erfolgte eine Deeskalation aufgrund von Toxizität oder anderen Nebenwirkungen/Faktoren. Die Behandlungsdosis der nachfolgenden Radiotherapie betrug bei 80 Patienten mindestens 70 Gy; wegen eines vorzeitigen Therapieabbruchs erhielten nur 7 Patienten eine geringere Dosis.

Als Kombitherapie erhielten 70 Patienten entweder eine Radiochemo – oder eine Radioimmuntherapie, davon bekamen 63 Patienten eine simultane Radiochemotherapie. Von diesen erhielten 62 Patienten Cisplatin, teilweise in Kombination mit 5-Fluoruracil. Bei vier dieser Patienten wurde infolge von Toxizitäten auf Cetuximab gewechselt. Sieben Patienten erhielten direkt eine Radioimmuntherapie mit Cetuximab nach dem Bonner-Schema (87).

4.2 Ergebnisse der Überlebensanalyse

4.2.1 Rauchen unter Therapie

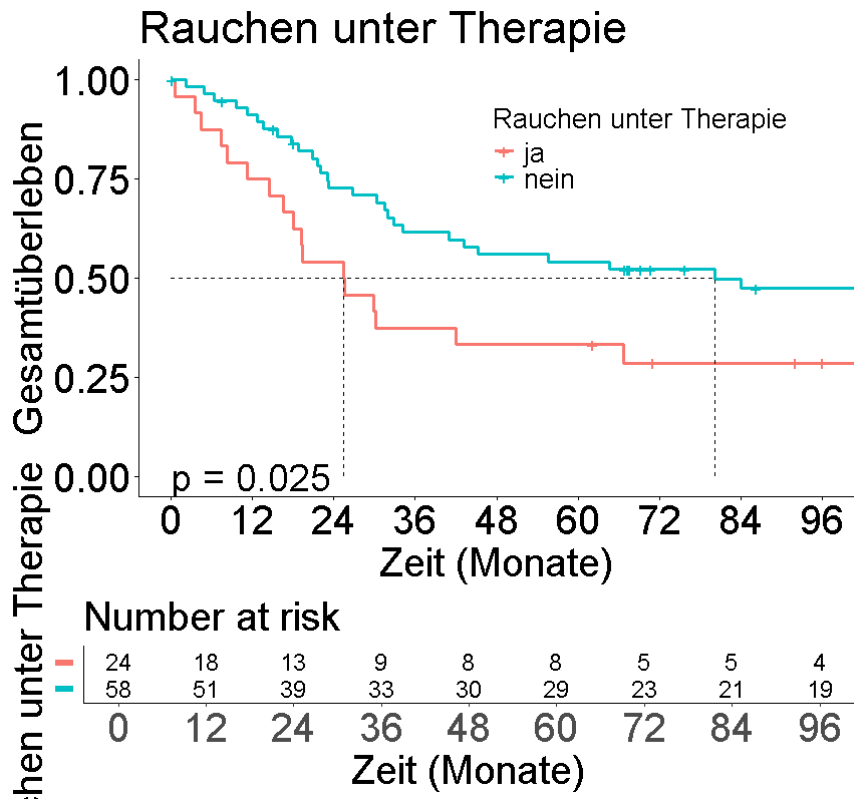


Abbildung 1

In der Analyse in Abbildung 1 zum Rauchen unter Therapie betrug das mediane Überleben 43,2 Monate (95%-KI: 30 – 139 Monate).

Mit einer statistischen Signifikanz mit einem p-Wert von 0.0025 konnte in der univariaten Analyse gezeigt werden, dass Patienten, die während der Therapie weiter rauchten, ein signifikant verschlechtertes Überleben mit einem Median von nur 25 Monaten (18 – Not available) hatten. Hingegen zeigten Nichtraucher eine deutlich längere Überlebenszeit von 80 Monaten (34 – Not available).

4.2.2 Alkohol unter Therapie

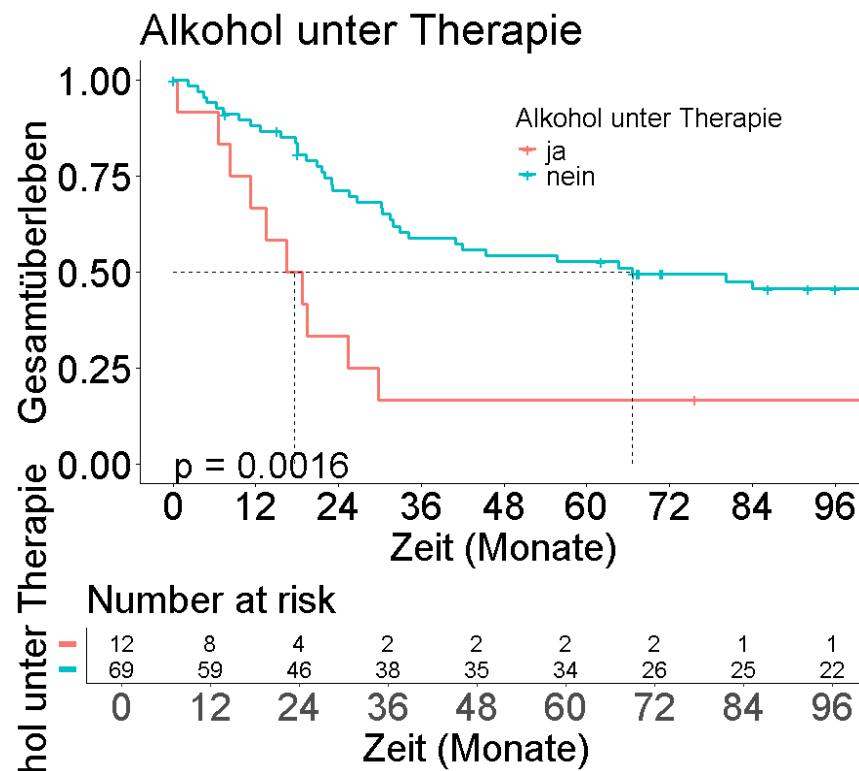


Abbildung 2

Die Analyse in Abbildung 2 zeigt, dass Patienten mit und ohne Alkoholkonsum zu Beginn in etwa eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 1,0 (100%) haben. Alkoholkonsumierende Patienten weisen mit zunehmender Zeit – verglichen mit der Nicht-Alkohol-Gruppe - eine hochsignifikant steilere Abnahme der Überlebenszeit (p-Wert von 0.0016) auf. Somit zeigt die Analyse deutlich, dass das Gesamtüberleben unter Alkoholeinfluss signifikant verringert ist im Vergleich zu den Patienten, die keinen Alkohol konsumierten. Das mediane Überleben betrug bei alkoholkonsumierenden Patienten unter Therapie 17 Monate (11 – Not available) vs. 66 Monate in der Nicht-Alkohol-Gruppe (39 – Not available).

4.2.3 Status der Lymphknotenmetastasierung cN0 und cN+

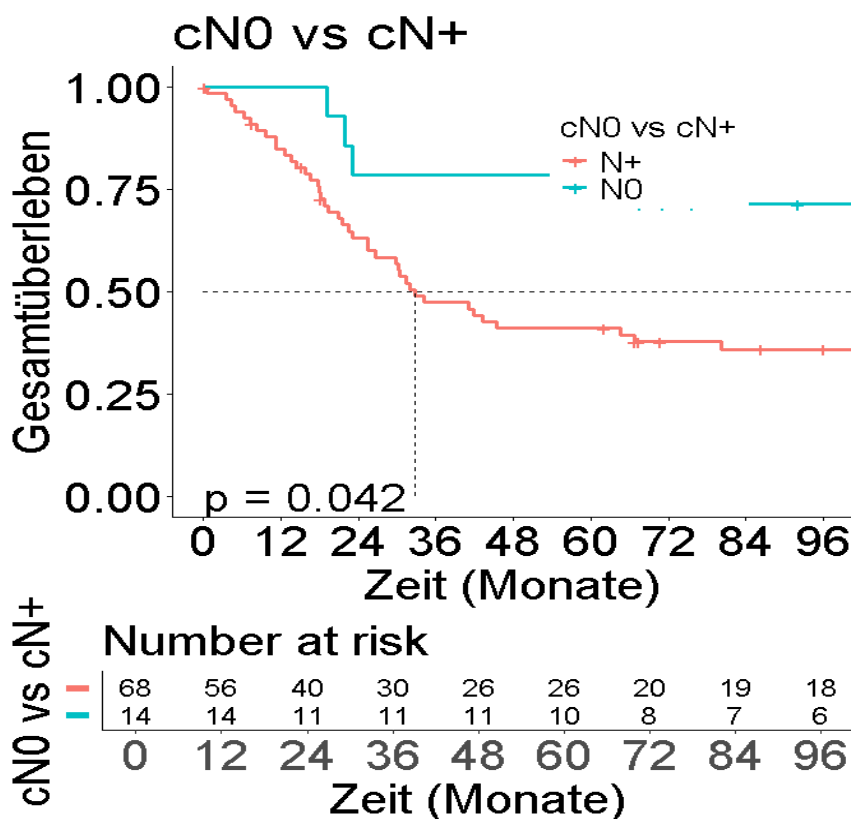


Abbildung 3

Eine signifikant bessere Überlebensrate (p-Wert 0.042) über den gesamten beobachteten Zeitraum von 96 Monaten zeigen Patienten ohne klinisch nachweisbare Lymphknotenmetastasen (N0) mit einer entsprechend günstigen Prognose im Vergleich zu den Patienten mit klinisch nachweisbaren Lymphknotenmetastasen (N+). Letztere weisen eine deutlich steilere Kurve auf, mit einem Plateau nach etwa 36 Monaten, welches einem Überleben von 50 Prozent entspricht. Die „number at risk“ nimmt in beiden Gruppen stetig ab; nach 96 Monaten haben 18 Patienten in der N+ und 6 Patienten in der N0-Gruppe überlebt.

Das mediane Überleben betrug in der cN1-3 – Gruppe 32 Monate (25,5 – Not available) und 138,7 Monate in der cN0-Gruppe.

4.2.4 Cisplatindosis

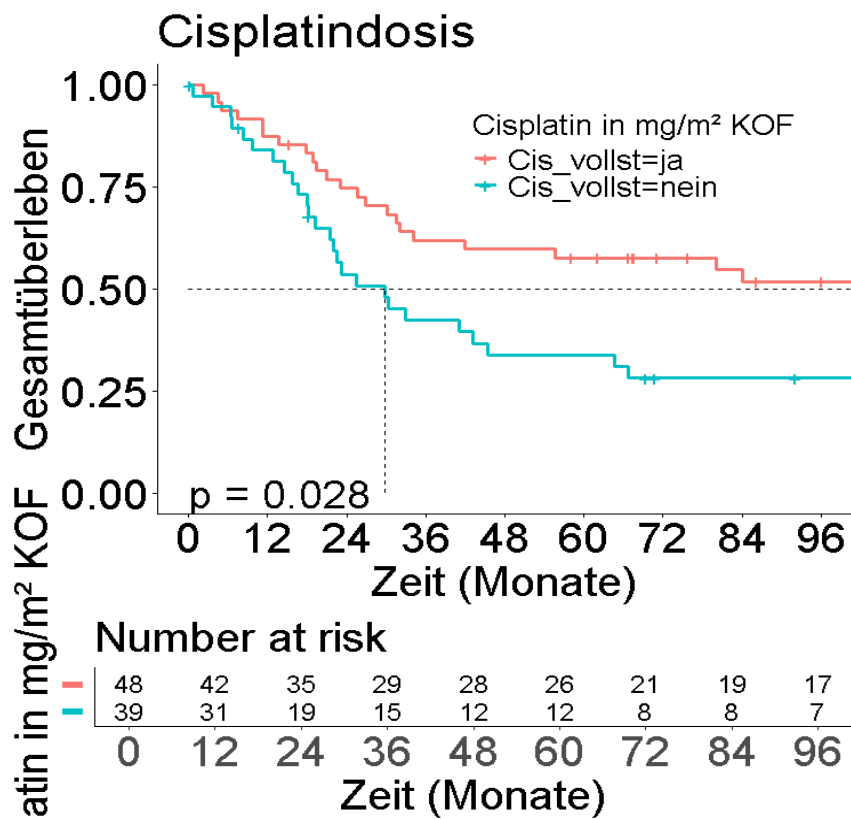


Abbildung 4

Die oben gezeigte Analyse zeigt den Einfluss der applizierten Cisplatindosis mit einer tendenziell besseren Überlebensrate in der Gruppe mit vollständiger Verabreichung der Cisplatindosis im Vergleich zur Gruppe mit einer Cisplatindosis von weniger als 200 mg während der Therapie (p-Wert = 0.028). Es zeigte sich ein statistisch signifikant kürzeres medianes Überleben bei Teilverabreichung von Cisplatin mit 30 Monaten (21-67 Monate) im Vergleich zur Gruppe mit vollständiger Dosisverabreichung von 127 Monaten (34 – not available).

Auch wenn die Ergebnisse der univariaten Analyse signifikant sind, zeigt die multivariate Analyse keine signifikanten Unterschiede.

4.2.5 Tumorlokalisation

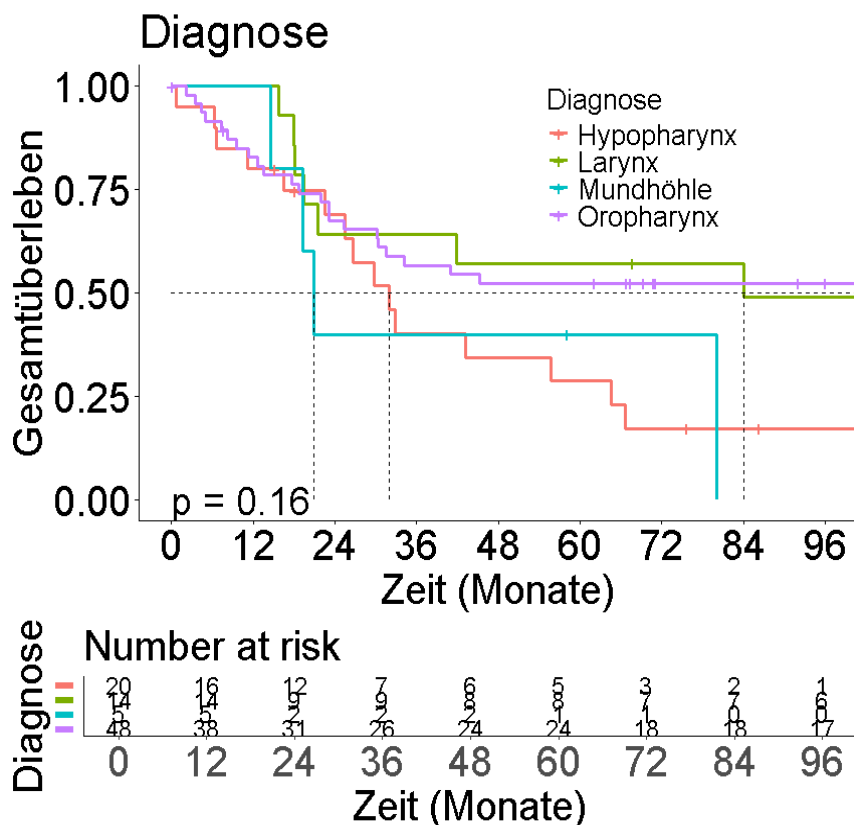


Abbildung 5

Die obigen Kaplan-Meier-Kurven veranschaulichen im Zeitraum von 96 Monaten die Überlebensraten verschiedener Diagnosegruppen von Kopf-Hals-Tumoren. Das Hypopharynxkarzinom zeigt ein medianes Überleben von 32 Monaten (95 % -KI: 25,5 – 66,6). Die schlechteste Überlebensrate unter den vier Gruppen hatte das Mundhöhlenkarzinom mit 20,9 Monaten (95 % -KI: 19,3 – not available) medianes Überleben. Das Oropharynxkarzinom zeigt die beste Überlebensrate mit bis zu 117 Monaten (95%-KI: 30,3 – not available). An zweiter Position nachdem Oropharynxkarzinom folgt das Larynxkarzinom mit einem medianen Überleben von 84 Monaten (95 % -KI: 21,5 – not available). Jedoch fehlt bei den Ergebnissen mit einem p-Wert von 0.16 die statistische Signifikanz, was eher auf die relativ kleine Fallzahl zurückzuführen ist.

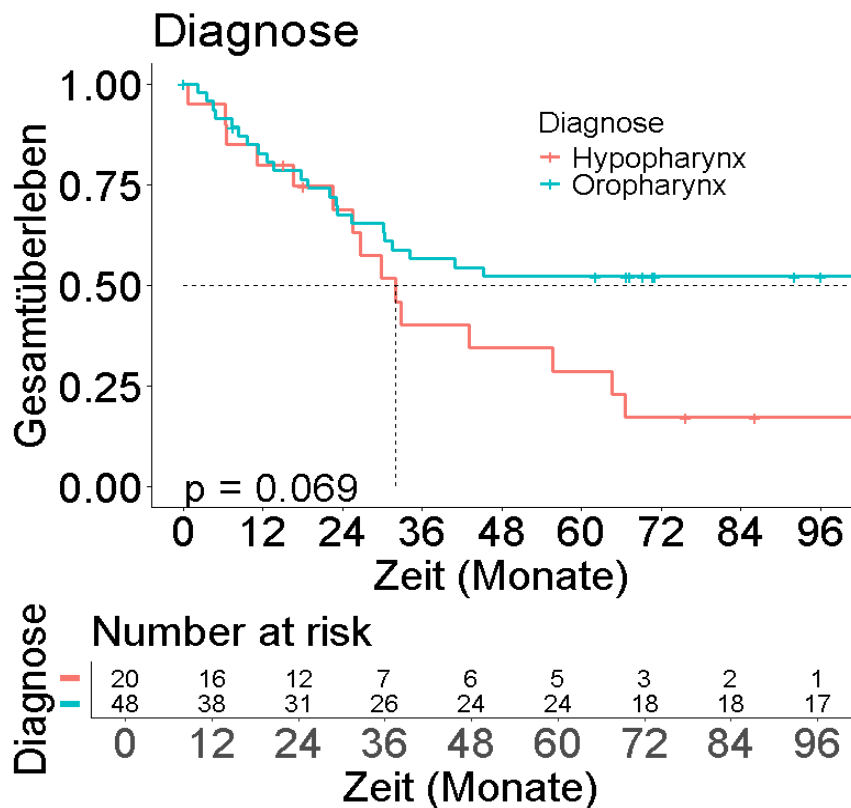


Abbildung 6

Im Vergleich zu den Überlebensraten aus Abbildung 5, bei denen unterschiedliche Tumorgruppen und ein statistisch nicht signifikante p-Wert von 0.16 vorliegen, sieht man hingegen in Abbildung 6 bei fokussierter Betrachtung der unterschiedlichen Tumorlokalisationen – hier exemplarisch des Hypo- und Oropharynx mit einem p-Wert von 0.07 eine grenzwertige Signifikanz. Die unterschiedlichen Tumorlokalisationen müssen also getrennt betrachtet werden.

4.2.6 Überlebensanalyse für das Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben nur für Oropharynxkarzinome betrachtet.

Da die Fallzahl zur Analyse nur für Oropharynxkarzinome sinnvoll erscheint wird die Überlebensanalyse auf diese Tumorlokalisation beschränkt:

Folgende Faktoren mit entsprechendem p-Wert sind nicht signifikant (p-Wert >0.05) für das Gesamtüberleben:

- Patientencharakteristika:
 - Alter (p-Wert = 0.07)
 - Karnofsky (p-Wert = 0.5)
 - Raucheranamnese (p-Wert = 0.5)
 - Rauchen unter Therapie (p-Wert = 0.8)
 - Alkohol unter Therapie - grenzwertige Signifikanz (p-Wert = 0.09)

- Tumorcharakteristika:
 - T-Stadium (p-Wert = 0.9)
 - N-Stadium (p-Wert = 0.07)

- Therapiecharakteristika:
 - Induktions-Chemotherapie (p-Wert = 0.7)
 - Simultane Chemotherapie (p-Wert = 0.4)
 - Cisplatin > 200 (p-Wert = 0.5)
 - RT-Dosis (p-Wert = 0.5)
 - Therapieabbruch (p-Wert = 0.2)

Folgende Faktoren mit entsprechendem p-Wert sind nicht signifikant (p-Wert >0.05) für das progressionsfreie Überleben:

- Patientencharakteristika
 - Karnofsky (p-Wert = 0.7)
 - Raucheranamnese (p-Wert = 0.6)
 - Rauchen unter Therapie (p-Wert = 0.9)
 - Alkohol unter Therapie (p-Wert = 0.1)

- Tumorcharakteristika:
 - T-Stadium (p-Wert = 0.9)
 - N-Stadium (p-Wert = 0.4)

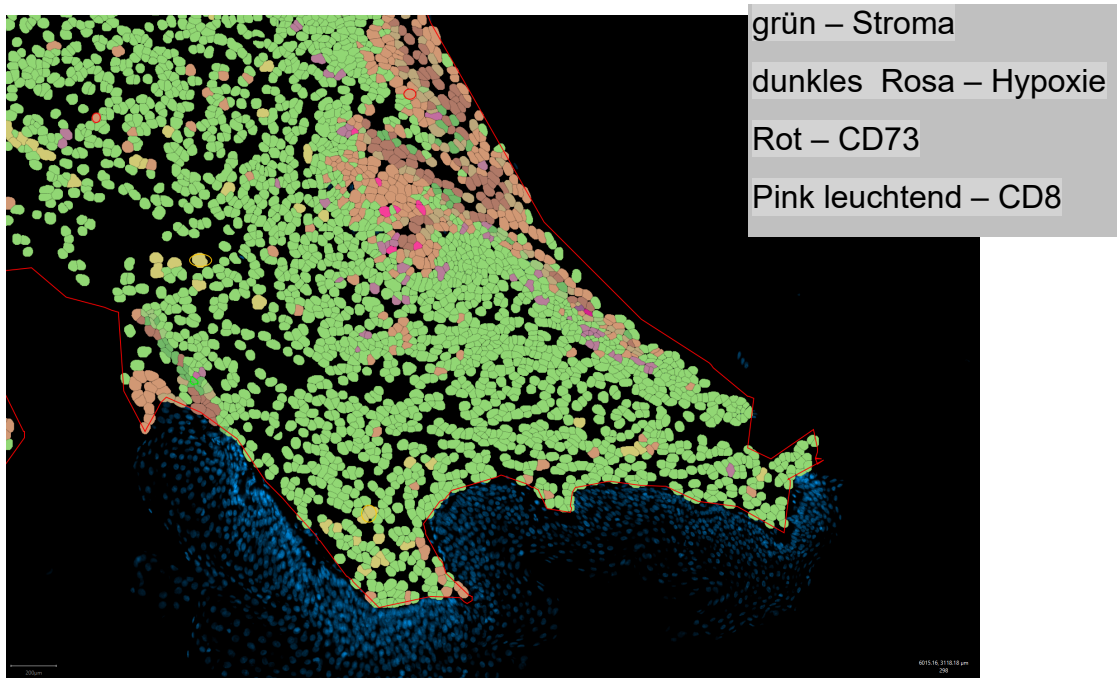
- Therapiecharakteristika:
 - Induktionschemo (p-Wert = 0.5)
 - Simultane Chemotherapie (p-Wert = 0.3)
 - Cisplatin > 200 (p-Wert = 0.6)
 - RT-Dosis (p-Wert = 0.4)
 - Therapieabbruch (p-Wert = 0.2)

4.3 Ergebnisse der Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung

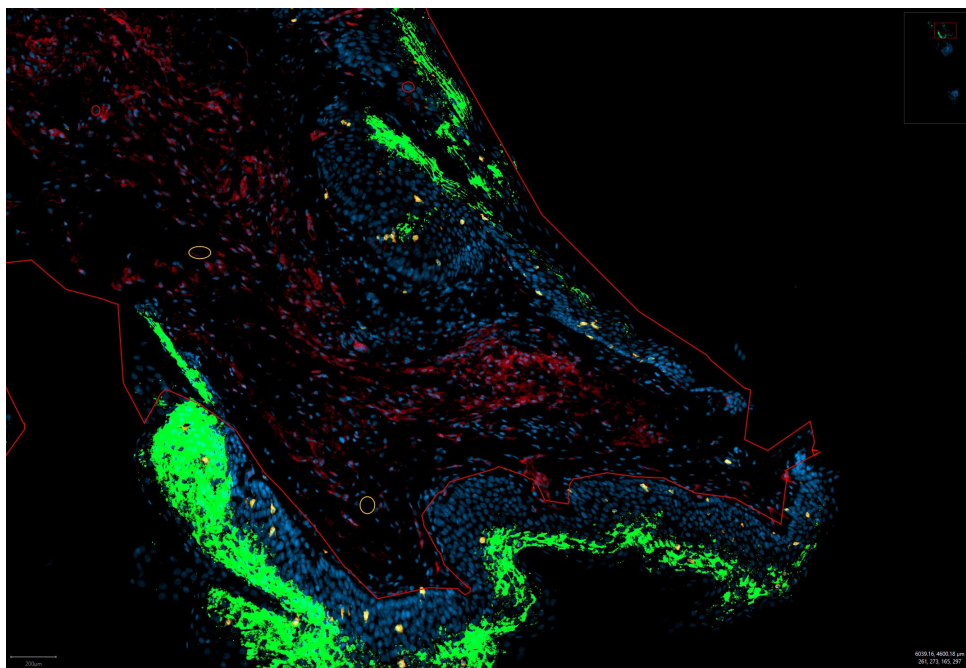
4.3.1 Immunfluoreszenzfärbung

Abbildung 7 (IF129_VI92)

A



B



Repräsentativer Ausschnitt eines Larynxkarzinoms, 10 x Vergrößerung

-schlechte Zelldetektion-

Jeweils unten links im Bild befindet sich der Maßstabsbalken mit einer Distanz von 200 μm .

Bild A zeigt die Einzelzelldetektions-Analyse in QuPath, wobei die rote Umrandung den interessierenden Bereich (Region of Interest ROI) markiert. Darin sind in Grün das Stroma, dunkles Rosa die Hypoxie, helles Rosa CD73 und Pink CD8 markiert.

Bild B stellt unterschiedliche Farbkanäle dar: DAPI in Blau, CA IX in Grün, CD8 in Gelb und CD73 in Rot. In diesem Präparat sind sehr wenige Tumoranteile (Rosa) als Stroma Anteile (Grün) in der ROI erfasst. Fast alle als CD8 positiv (Gelb) markierten Zellen sind fälschlicherweise als positiv markiert, und CD73-positive Zellen nicht detektiert worden.

Abbildung 8 (IF125_VI47)

A

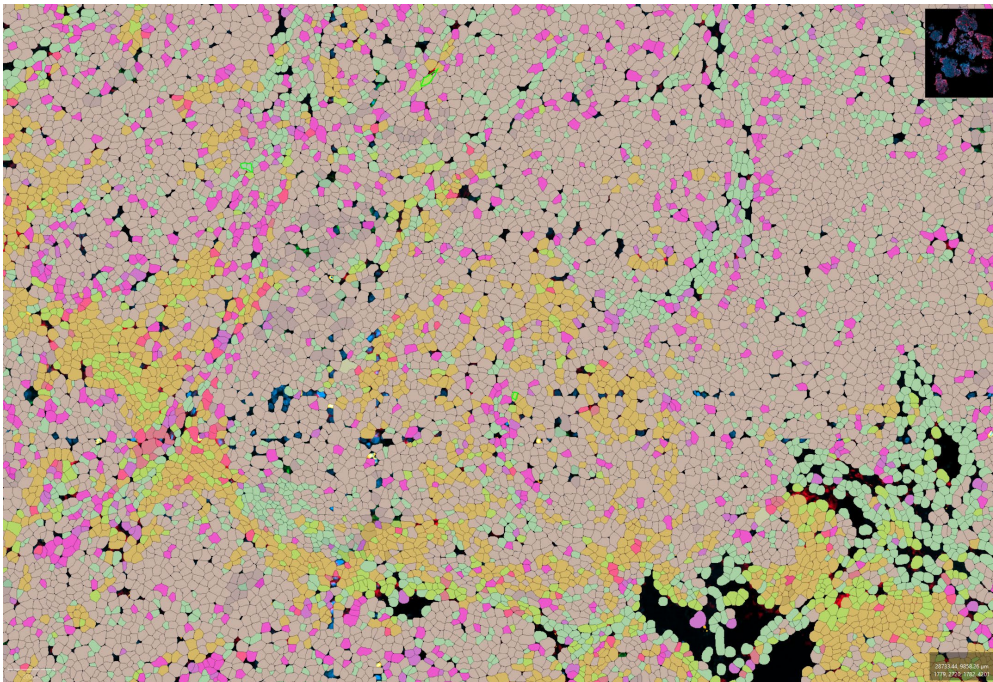
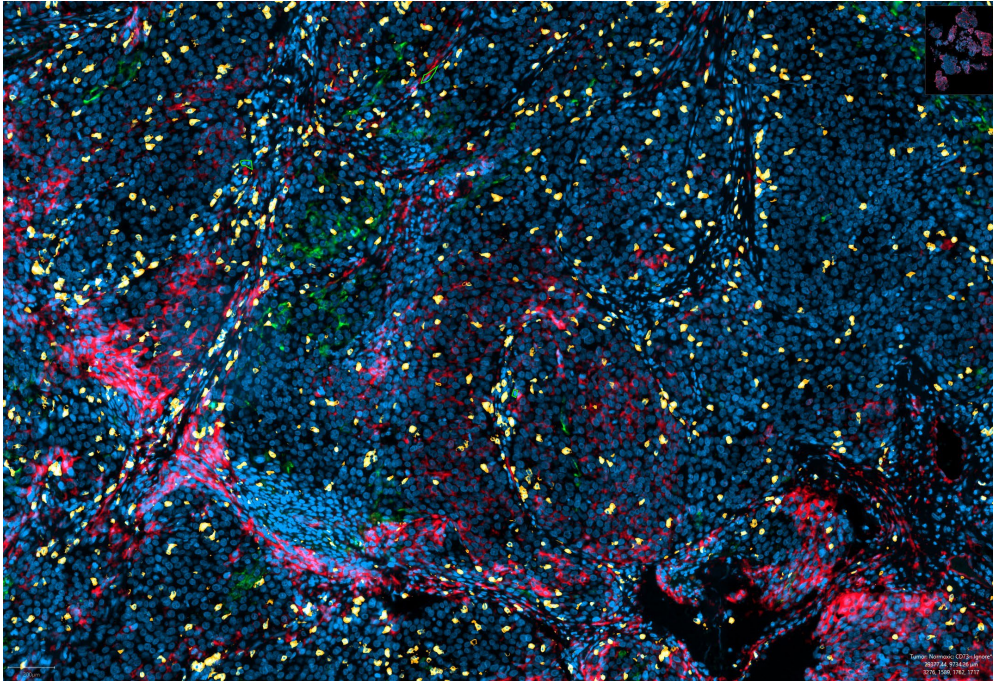


Abbildung 8 (IF125_VI47)

B



Repräsentativer Ausschnitt eines Hypopharynxkarzinom 10 x Vergrößerung

-optimale Zelldetektion-

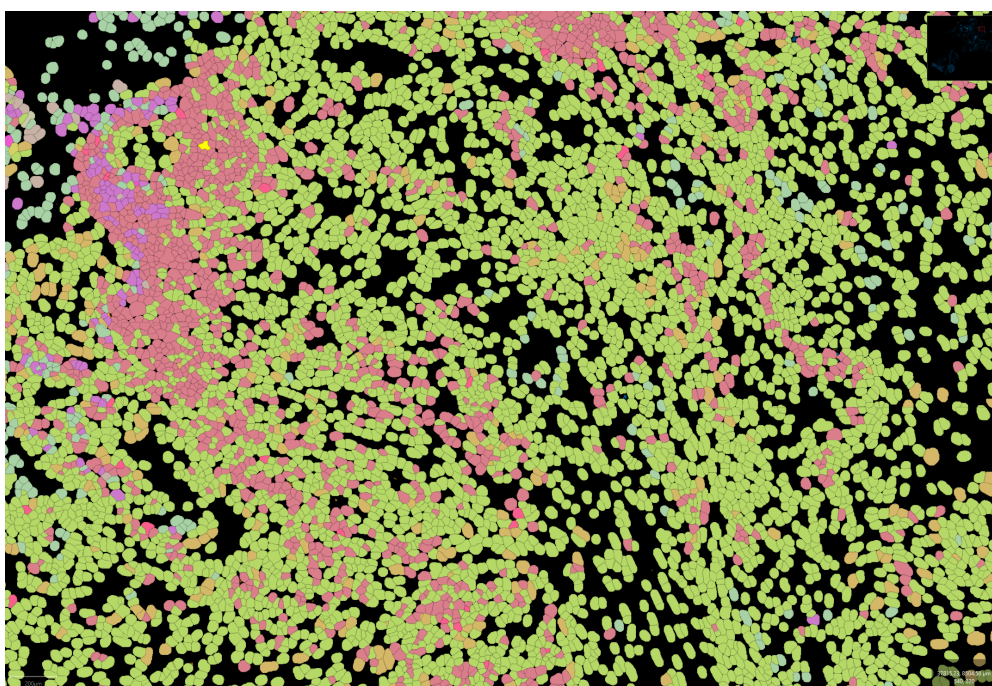
Jeweils unten links im Bild befindet sich der Maßstabsbalken mit einer Distanz von 200 μm .

Bild A zeigt reichlich erfasstes Tumorzellgewebe (Rosa) und wenig Stroma-Gewebe (Grün).

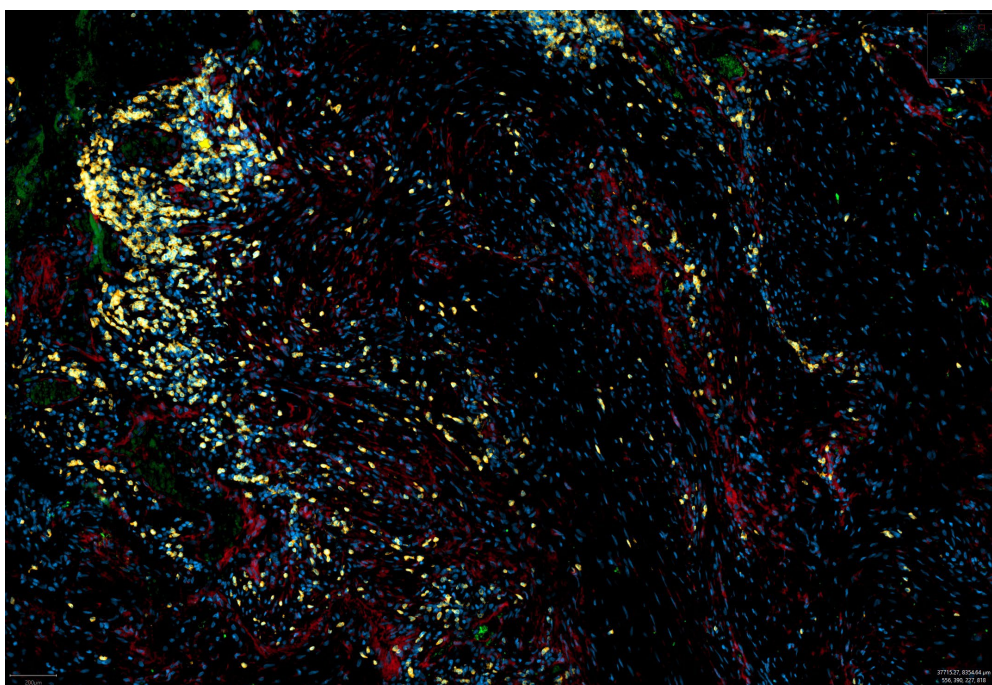
Bild B zeigt eine gut detektierte CD73-Expression (Rot) sowohl im Stroma in der unteren Bildhälfte als auch im Tumorgewebe, sowie im Tumorgewebe in der oberen Bildhälfte. Das Signal des Hypoxie-Markers CA-IX ist relativ schwach, aber im gesamten Schnittpräparat exprimiert, wobei es den Anschein hat, dass viele hypoxische Bereiche in den Tumoranteilen zu finden sind. CD8 (Gelb) wird ebenfalls verteilt im Gewebe optimal detektiert.

Abbildung 9 (IF129_VI89)

A



B



Repräsentativer Ausschnitt eines Oropharynx-Karzinoms, 10x Vergrößerung
-optimal bis mittelgradige Zelldetektion-

Jeweils unten links im Bild befindet sich der Maßstabsbalken mit einer Distanz von 200 μm .

Bild A zeigt reichlich erfasstes Stroma-Gewebe (Grün) und sehr spärliches Tumorgewebe (Rot). Bild B zeigt eine starke CD8-Expression (Gelb) im Tumorgewebe. In den zellfreien Bereichen erfolgt eine falsch positive Detektion des Hypoxie-Markers CA-IX (Grün).

Abbildung 10 (IF129_VI88)

A

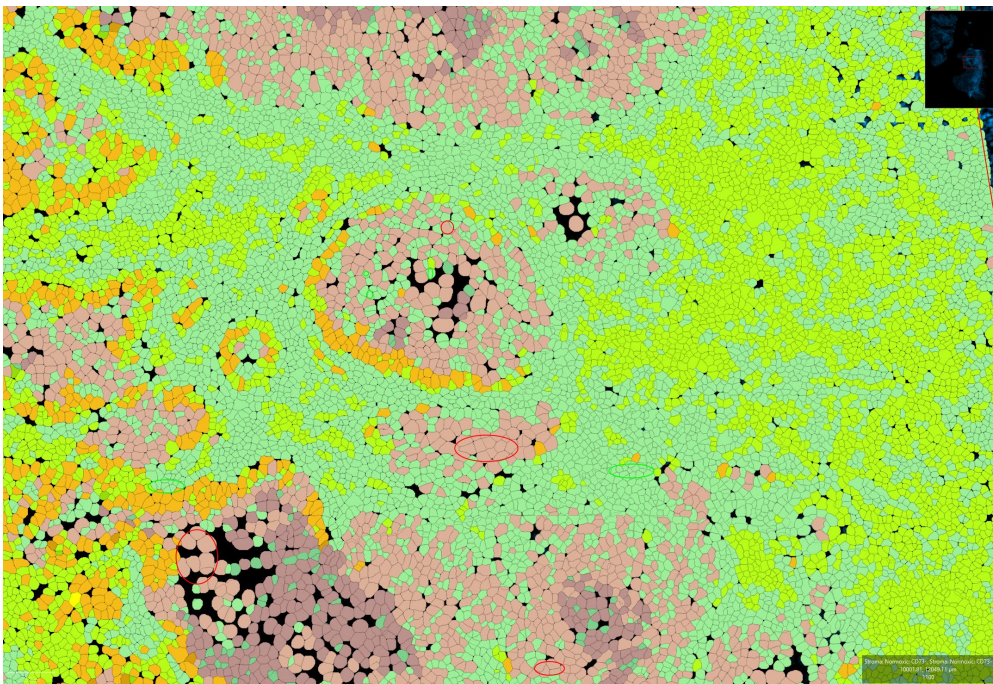
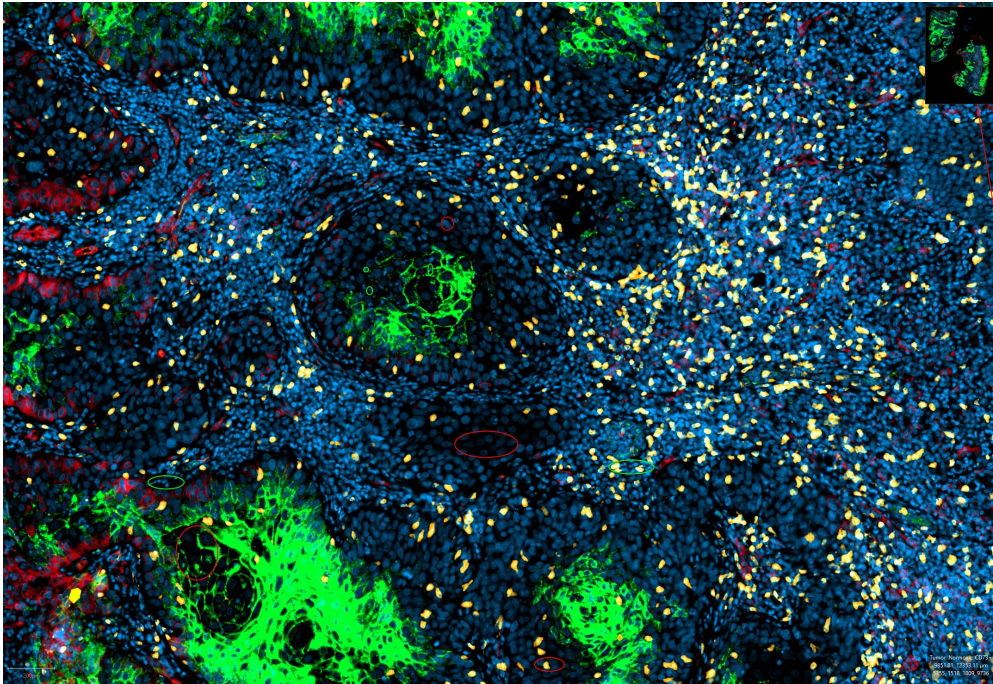


Abbildung 10 (IF129_VI88)

B



Repräsentativer Ausschnitt eines Hypopharynx-Karzinom, 10x Vergrößerung

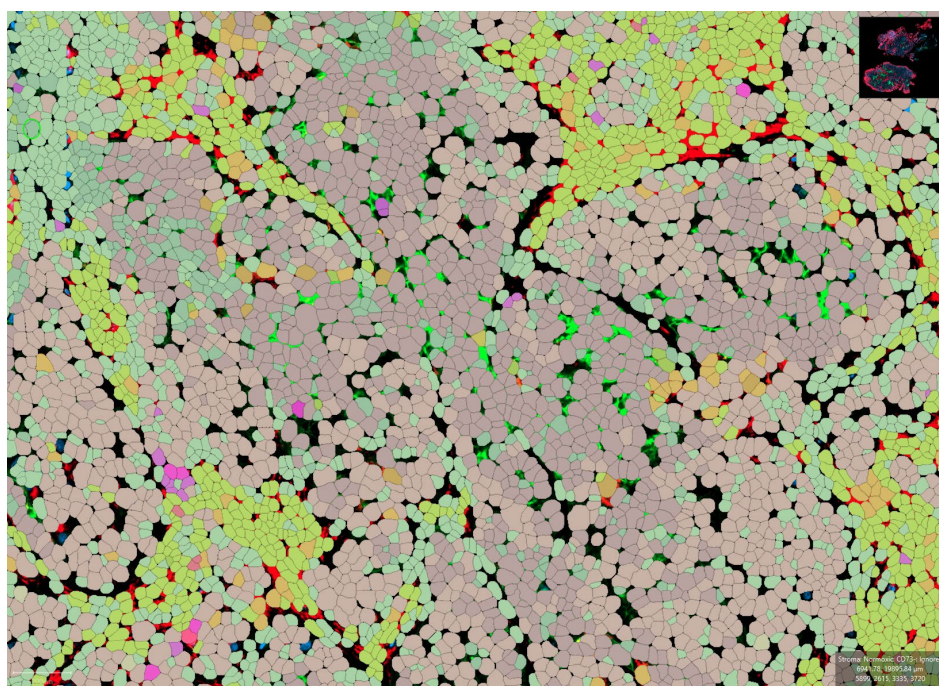
-mittelgradige Zelldetektion-

Jeweils unten links im Bild befindet sich der Maßstabsbalken mit einer Distanz von 200 µm.

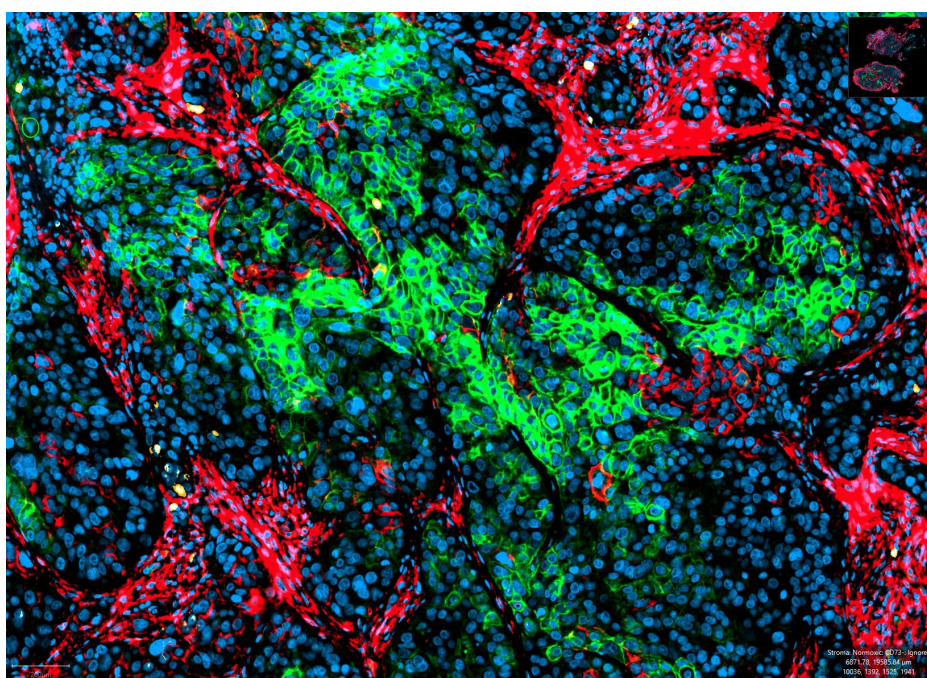
Die in Bild B Gelb dargestellten CD8 positiven Zellen sind bei der Einzelzelldetektion in Bild A - insbesondere im linken seitlichen Bildbereich – nicht zu erkennen, was auf eine ausgebliebene Subtypisierung hindeutet. Der Hypoxie-Marker wird kräftig in Bild B Grün detektiert und korreliert in Bild A mit dunkelrosa. Die Relation zwischen Stroma (Grün) und Tumor (Rot) zugunsten des Stromas.

Abbildung 11 (IF131_VII20)

A



B



Repräsentativer Ausschnitt eines Mundhöhlen-Karzinom, 10x Vergrößerung
-optimale Zelldetektion-

Jeweils unten links im Bild befindet sich der Maßstabsbalken mit einer Distanz von 200 μm .

Bild A zeigt reichlich detektiertes Tumorgewebe (Rot) mit prominenten Zellkernen, die mit DAPI (Blau) gefärbt sind.

Bild B zeigt eine starke Expression und Detektion von CD73 (Rot) und CAIX (Grün), die in Bild A in hellem Grün und dunklem Rosa dargestellt sind.

Die Ergebnisse der visuellen Auswertung ergaben unterschiedliche Expressionsmuster hinsichtlich der räumlichen Lokalisationen von CD73- und CD8-positiven Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass sich CD8-positive T-Zellpopulationen in unmittelbarer Nähe oder an CD73-positiven Zellen detektieren ließen.

Hier könnte eine Interaktion oder das Vorhandensein eines immunsuppressiven Effektes der Grund dafür sein. Ein weiteres Färbeverhalten zeigte unterschiedliche räumliche Lokalisationen von CD73-positiven Zellen im Tumor und CD8-positiven Zellen in den Randbereichen des Tumorgewebes. Hier wäre eine Hemmung von CD8-positiven Zellen durch die immunsuppressive Wirkung von CD73 denkbar und könnte eine durch CD73 vermittelte, tumorbedingte Immunflucht erklären. Zuletzt waren auch CD8-positve Zellcluster in Stroma- oder anderen CD73-exprimierenden immunregulatorischen Zellen zu sehen, und nur vereinzelt im Tumorgewebe. Des Weiteren konnten vereinzelt CD8-Infiltration in den hypoxischen Gewebearealen nachgewiesen werden.

4.3.2 Statistische Auswertung der Immunfluoreszenz

| Charakteristika | Hypopharynx, N = 17¹ | Larynx, N = 10¹ | Mundhöhle, N = 5¹ | Oropharynx, N = 42¹ |
|---|--|---------------------------------------|---|---|
| Hypoxischer Tumoranteil (%) | 7 (4 - 32) | 3 (2 - 14) | 17 (3 - 21) | 15 (6 - 23) |
| CD73-positiver Tumoranteil (%) | 10 (5 - 24) | 15 (13 - 37) | 19 (19 - 24) | 15 (6 - 42) |
| CD73-positiver Stromaanteil | 37 (20 - 51) | 49 (34 - 60) | 60 (54 - 63) | 49 (35 - 64) |
| CD8-positive Zellen (% der gesamten ROI) | 5.9 (2.7 - 6.9) | 3.0 (1.8 - 5.6) | 4.5 (2.4 - 4.8) | 3.8 (2.7 - 7.2) |
| Tumor-infiltrierende CD8-positive Zellen (% der CD8-positiven Zellen) | 7 (4 - 11) | 1 (0 - 8) | 1 (1 - 2) | 5 (2 - 14) |

¹Median (IQR)

Tabelle 5

Die Zelleinteilung bzw. die Beurteilung des Färbeergebnis der Immunfluoreszenzfärbung wurde visuell in QuPath erstellt (siehe Kapitel 3.2.11).

Für die Erstellung der oben dargestellten Tabelle 5 wurden nur die Immunfluoreszenzfärbungen mit visueller Einstufung des Färbeergebnisses/Zelleinteilung als „optimal“ oder „optimal/mittel“ entsprechend 65 Schnittpräparaten sowie 14 Schnittpräparate mit „mittel“ einbezogen – entsprechend einer Gesamtanzahl an ausgewerteten Patienten von 74 (N=74) mit einem Primärtumor. Sechs Schnitte waren nicht auswertbar und zwei wurden als mittel-schlecht eingestuft.

Tumoren der Mundhöhle weisen einen wesentlich höheren Anteil an hypoxischen Tumorzellen auf (17 %), insbesondere im Vergleich zu den Larynx-Tumoren mit nur 3 %. Der höchste Anteil CD73-positiven Zellen im Tumoranteil wurde in der Mundhöhle (19 %) nachgewiesen, der niedrigste im Hypopharynx (10 %). Im Stromaanteil wurde ein hoher Anteil an CD73-positiven Zellen ebenfalls in der Mundhöhle (60 %) detektiert. Der höchste Anteil an CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen im gesamten Tumorgewebe wurde im Hypopharynx (5.9 %) gefunden. Der Anteil an tumorinfiltrierenden CD8-positiven Zellen ist ebenfalls im Hypopharynx am größten.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Diskussion der Multiplex-Immunhistochemie-Methode

Kreuzreaktionen sowie Interferenzen

Die Multiplex-Immunhistochemie-Methode erlaubt die gleichzeitige Detektion von Expressionsmustern mehrerer Targetproteine. Fehlerquellen bei der Anwendung dieser Methode können Kreuzreaktionen und die Überlappung von Fluoreszenzfarbstoffen sein, weshalb die Kombination der Fluorochrome mit Bedacht erfolgen muss, damit genaue und eindeutige Farbsignale detektiert werden können.

Möglicherweise könnte auch die Gewebeentnahme, -fixation und -einbettung z.B. in Form einer mangelnden Autofluoreszenzunterdrückung, das Ergebnis beeinflussen haben. Dadurch könnten Färbemuster entstehen, die zu einer Verzerrung der weiteren nachgelagerten Analyse führen.

Eine weitere potentielle Fehlerquelle ist die unzureichende Blockierung von Hintergrundsignalen mit der Entstehung von unspezifischen Bindungsstellen und Hintergrundrauschaktivität. Des Weiteren kann bei nicht sorgfältigem Auswaschen der ungebundenen Antikörper ebenfalls eine unspezifische Hintergrundfärbung mit unzuverlässigen Ergebnissen resultieren. Quenching-Effekte bei der Verwendung mehrerer Fluorochrome können die Detektion vermindern. Eine weitere Beachtung sollte dem Photobleaching mit übermäßiger Belichtung und der daraus resultierenden abnehmenden Fluoreszenzintensität geschenkt werden. Interne Kontrollen, wie der Einsatz von positiven und negativen Kontrollen und die Validierung der Antikörper, spielen eine weitere Rolle, um zuverlässige Ergebnisse zu gewährleisten.

Dank des aktuellen laboranalytischen Fortschritts erscheint die Problematik der Autofluoreszenz nicht von signifikanter Bedeutung.

Eine weitere Herausforderung stellt die Gewebeheterogenität dar, welche zu Signalunterschieden führen kann und somit die Auswertung komplexer machen kann. Diese oben genannten Punkte verdeutlichen die Notwendigkeit eines sorgfältigen und durchdachten Ansatzes bei der Anwendung der Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung.

Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie ist bei der Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung die Kombination und die Anzahl der in einem Präparat detektierbaren Fluorochrom-markierten Antikörper wichtig, damit sich diese nicht in Ihrem Emissionsspektrum überlappen. Bei bester Optimierung und Vorauswahl können in etwa fünf Antigene in einem Gewebeschnitt nachgewiesen werden (88).

Eine Qualitätsverbesserung und Steigerung der Aussagekraft der Methode kann bei Berücksichtigung dieser Fehlerquellen maximiert werden.

Um dieser Limitation der maximalen simultanen Amplifikation von Antigenen zu umgehen, kann statt der in dieser Arbeit verwendeten tyraminbasierten Signalamplifikation beispielsweise eine multispektrale Immunfluoreszenz verwendet werden, bei der ein definierter Fluoreszenzkanal (einzelne Bilder/Bildstapel mit variablen und verschiebbaren Filterspektren, und somit bis zu sieben Farbkanäle gleichzeitig) analysiert wird (89). Eine weitere neuere Methode mit einer wesentlich besseren Differenzierung ist das Multiplex-Ion-beam-Imaging (Multiplex-Ionenstrahl-Imaging), das auf dem Prinzip der deutlich feineren Ionenstrahlbildung basiert (90).

5.1.2 QuPath

Bei der QuPath-Auswertung wird klar, dass die Probleme bei der einzelzellbasierten Analyse eines "Whole-slide" -Präparates auf die zu geringe Anzahl gleichzeitig darstellbarer Antigene in der Immunfluoreszenz und damit auf einen entscheidenden Schwachpunkt zurückzuführen sind.

Die Analyse ist sicherlich eine anspruchsvolle Aufgabe, die eine gewisse Subjektivität, Fehleranfälligkeit und eingeschränkte Reproduzierbarkeit mit sich bringt.

Somit ist es notwendig, von Schnitt zu Schnitt manuell neue Grenzwerte zu definieren. Beispielsweise kann die vom Untersucher subjektiv getroffene Einstufung, ob eine CA-IX Expression hinreichend stark ist, um als hypoxisch klassifiziert zu werden, abweichen.

Ein weiteres Problem ist die Autofluoreszenz der Erythrozyten im FITC-Kanal, die nicht mit der CA-IX-Expression fehlinterpretiert werden darf, da dies zu einer falschen Hypoxie-Einstufung führen kann, insbesondere aufgrund der Nachbarschaft von Zellen größerer Gefäße. Die DAPI-Färbung ist zellkernbasiert, da die Erythrozyten jedoch keinen Zellkern besitzen, werden leere Räume definiert. Dies wiederum bewirkt, dass Zellen an Gefäßwänden größer wirken, als Sie tatsächlich sind, und fehlerhaft als Erythrozyten eingeordnet werden, was zu signifikant verfälschten Ergebnissen führt. Folglich könnte eine Präzisionsoptimierung der Antigen- und Zellklassifizierung mithilfe von universellen Membranmarkern wie HIF-1- α oder VEGF helfen (91). Um die Autofluoreszenz der Erythrozyten zu umgehen und um damit präzisere Ergebnisse zu erzielen, sind alternative Technologien wie „Imaging Mass-Cytometry“ oder „Ion-Beam-Imaging“ als Alternative denkbar.

Wie in Abb. 7 dargestellt, kann des Weiteren ein falscher Ansatz bei der Klassifikation von Stroma und Tumorzellen, insbesondere in den Grenzbereichen, vorliegen.

In Abb.9B wird gezeigt, dass CA-IX als Hypoxie-Marker nicht alle bzw. falsche hypoxische Gewebeareale erfasst. Hilfreich wäre dabei, wie oben bereits erwähnt, die Verwendung ergänzender Hypoxie-Marker, um ein detaillierteres Bild des Tumormikromilieus zu gewinnen (92).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Diskussion der deskriptiven Statistik

Die Datenbasis für die durchgeführte Analyse bildete ein Kollektiv von 87 Patienten. Der größte Anteil davon waren männliche Studienteilnehmer, und das Durchschnittsalter betrug 59 Jahre. Die überwiegende Mehrheit der vom Pathologischen Institut der Universitätsmedizin zur Verfügung gestellten Schnittpräparate stammte aus Primärtumoren, wobei in diesem Kollektiv am häufigsten Oropharynx- und Zungengrundkarzinome diagnostiziert wurden.

Eine mögliche Ursache für die fehlende Bestätigung der Hypothese, dass Hypoxie ein relevanter Faktor in der antitumoralen Immunaktivität ist, könnte die zu kleine Kohorte sein, die nicht repräsentativ genug war. Unklare, nicht dokumentierte Zufallsereignisse könnten ebenfalls einen verzerrenden Einfluss gehabt haben.

Des Weiteren könnte die Heterogenität des Tumors bzw. des repräsentativen Gewebeschnitts, der analysiert wurde, das möglicherweise zu kleine Gewebebiopsat oder unterschiedliche Gewebepräparationen mit ungenügender Erfassung oder Widerspiegelung der Tumorgrenzen die Ursache sein. Auch geschlechtsspezifische Tumormerkmale und die Auswahl der Analysemethode können das Ergebnis einer Untersuchung signifikant beeinflussen.

Ebenso könnte die Tumor-Stroma-Relation mit einem überwiegenden Anteil an Stroma und wenig Tumorgewebe zu dem hier gezeigten Ergebnis geführt haben und das von der Literatur abweichende Expressionsmuster von CD73 erklären.

CD73 ist ein Endothelzellmarker, der an den Gefäßwänden, also membranständig, exprimiert wird, meistens im gesamten Stroma oder in der Membran der dem Tumor durchziehenden Endothelzellen. Dies entsprach nicht dem Expressionsmuster in dieser Arbeit, obwohl in der Literatur in einigen Arbeiten eine wichtige Bedeutung von CD73 in der endothelialen Funktion beschrieben wird (93). Die Hintergründe der starken stromalen Expression von CD73 sind derzeit offen.

Es konnte auch kein Zusammenhang zwischen den tumorinfiltrierenden CD8+ T-Lymphozyten und CD73 gezeigt werden, obwohl die immunsuppressive Wirkung auf das Tumormikromilieu die Effektivität der tumorinfiltrierenden CD8+ - T-Lymphozyten beeinträchtigen kann. Denkbare Gründe könnten einerseits ein nicht vorteilhaftes Milieu für zytotoxische T-Zellen oder die Gewebheterogenität des gewonnenen Materials sein. Tumor-infiltrierende Lymphozyten sind unter anderem auch ein prognostischer Risikofaktor, sodass die absolute oder relative Zahl dieser Zellen im Tumorgewebe schwierig zu bewerten ist (94). Ein weiterer Grund könnte auch ein unklarer Ruhezustand der CD8+ T-Lymphozyten sein.

Ein Vorteil dieser Arbeit ist die lange Nachbeobachtungszeit von 120 Monaten, die eine solide Datenerstellung mit valider Aussagekraft zum Langzeitüberleben und der therapieassoziierten Spätfolgen ermöglicht.

Die ausgewerteten Ergebnisse zeigten, dass die Mehrheit der Patienten (92%) eine gute bis moderate Gesamtverfassung aufwies mit ECOG-Status 0 oder 1. Diese Konstellation ist von Bedeutung, da ein besserer ECOG-Status in der Regel mit einer günstigeren Prognose einhergeht, weil die Patienten fitter sind und eine aggressive Therapie besser tolerieren bzw. besser durchstehen können, was einen positiven Einfluss auf Ihren Behandlungserfolg hat.

5.2.2 Diskussion der Überlebensanalysen

Die Mehrheit der Patienten in dieser Arbeit hatte einen ECOG-Status von Score 0 oder 1, was einer guten bis moderaten körperlichen Verfassung entspricht. Ein kleinerer Anteil wies jedoch einen ECOG-Status von 2 oder 3 auf. Eine Mangelernährung könnte bei diesen Patienten ein negatives Outcome begünstigt haben (95).

Auch wenn die Ausgangssituation überwiegend gut war, rauchte ein Großteil der Patienten während der Therapie weiter. Im Gegensatz dazu hatten weniger Patienten einen anhaltenden Alkoholkonsum. Dies zeigte sich signifikant im medianen Überleben unter der Therapie: 25 Monate für die Rauchenden und 80 Monate für die Nichtraucher. Bezüglich des progressionsfreien Überlebens erwies sich der Unterschied jedoch als nicht signifikant.

Diese Beobachtung muss berücksichtigt werden, da bereits Asita et al. zeigen konnten dass insbesondere das Rauchverhalten einen prognostischen Faktor bezüglich des Überlebensvorteils darstellt (96). Rauchen kann den Therapieeffekt verringern und die Nebenwirkungen fördern.

Gründe für ein ungünstiges Überlebensergebnis und eine schlechte Prognose bei Rauchern während der laufenden Behandlung können die Förderung von oxidativem Stress, Immunsuppression oder Komorbiditäten, die tabakassoziiert sind, sein (97). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Bestandteile die im Tabakrauch enthalten sind Enzyme beeinflussen können, die wiederum Medikamente metabolisieren und somit den Therapieerfolg unterbinden (98).

Auch das verringerte Therapieansprechen und die häufigeren Nebenwirkungen wie z.B. Mukositis, Xerostomie, Geschmack- und Gewichtsverlust, Fatigue und Osteonekrose, die möglicherweise einen Therapieabbruch fordern, können das Fortschreiten des Tumors und die schlechtere Überlebensrate erklären (99) (100-102).

Die Überlebensanalyse bezüglich des Lymphknotenstatus zeigte, dass bei insgesamt 72 Patienten der Tumor bereits im fortgeschrittenen T3 und T4 – Stadium sowie bei 62 Patienten im N2- Stadium vorlag, was auf eine fortgeschrittene lymphogene Metastasierung hinweist und eine ungünstigere Prognose andeutet. Eine späte Diagnosestellung des HNSCC, etwa durch unspezifische Symptome wie Halsschmerzen, Heiserkeit und Schluckbeschwerden, die leicht mit weniger schwerwiegenden Erkrankungen verwechselt werden können, könnte hierzu beigetragen haben. Da es kein spezifisches Früherkennungsprogramm für HNSCC gibt, wird die Diagnosestellung häufig erst in einem späten Stadium ermöglicht. Die Ergebnisse in dieser Arbeit waren eindeutig: Patienten im N0-Stadium überlebten signifikant länger (138,7 Monate) im Vergleich zu den Patienten im cN1-3 Stadium (32 Monate). Dies bestätigt die prognostische Relevanz des lymphogenen Metastasierungsstadiums als ungünstigen Marker.

Die Überlebensanalysen hinsichtlich der Tumorlokalisation konnten in dieser Arbeit zeigen, dass trotz der allgemein als schlechter eingestuften Überlebenschancen von Patienten mit Hypopharynxkarzinomen, keine signifikanten Unterschiede bestätigt wurden.

Erfolgt nun eine separate Betrachtung von Oro- und Hypopharynxkarzinomen zeigte sich, dass Patienten mit Oropharynxkarzinomen die besten Überlebensraten haben (103). Die funktionellen Einschränkungen wie Sprach – und Schluckprobleme mit einer resultierenden deutlichen Einschränkung der Lebensqualität könnten mögliche Gründe hierfür sein. Des Weiteren wäre auch die relativ kleine Patientenkohorte in dieser Studie ein weiterer Grund sein, der die statistische Power der Analyse beeinträchtigt.

Die bessere Ansprechbarkeit des Oropharynxkarzinoms auf die Therapie, ein frühes Stadium bei Diagnosestellung der HPV-positiven HNSCC oder ein günstiges biologisches Tumorverhalten sowie die hohe Heterogenität in den Diagnosegruppen könnten auch eine Rolle spielen.

Bei der HPV-assoziierten oropharyngealen HNSCC kann durch eine wichtige präventive Maßnahme mittels einer HPV-Impfung erfolgreich die Verringerung der Inzidenz erreicht werden (104).

Da es jedoch für eine weltweite Immunisierungsstrategie noch Herausforderungen wie Kosten, Impfskepsis und Falschinformationen gibt, könnte es möglicherweise so sein, dass die Inzidenz der HPV-assoziierten HNSCC weiter ansteigt, wohingegen die Zahl der durch Rauchen verursachten HNSCC rückläufig ist (105).

Als Ergebnis der Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung kann die vorsichtige Schlussfolgerung gezogen werden, dass Mundhöhlenkarzinome – im Vergleich zu den übrigen Tumorlokalisationen (siehe Tabelle 5) – infolge einer höheren hypoxischen Tumoranteils (17 %) möglicherweise unzureichender auf eine Radiochemotherapie ansprechen als Larynxkarzinome mit einem hypoxischen Tumoranteil von nur 3 %.

Das Ergebnis eines Übersichtsartikels über klinische und experimentelle Daten zeigte CAIX als ungünstigen Prognosefaktor bei Gebärmutterhalskrebs, aber auch Kopf- und Halskrebs (106). Obwohl Hypoxie ein histologisch gesicherter Faktor für den Misserfolg der Radiochemotherapie ist, konnte dies in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (107) (siehe Tabelle 5). Es wurde vielmehr ein eher untypisch geringer hypoxischer Tumorgewebeanteil detektiert in den untersuchten Tumorlokalisationen und auch kein signifikantes Ergebnis der Tumor infiltrierenden CD8+-T-Lymphozyten. Die Gründe dafür könnten die Tumorheterogenität, Gewebeinhomogenität, ein zu kleines Biopsat mit falschem Tumor-Stroma-Verhältnis, Fehler in der Gewebeaufbereitung und der Immunfluoreszenz-Detektion oder das zu kleine Patientenkollektiv sein.

Die Analysen der Therapieansätze in der Studie ergaben, dass ein signifikanter Anteil der Patienten eine Induktions-Chemotherapie erhalten hat. Dies impliziert, dass diese Therapieform weitgehend als effektiver Standard gilt, jedoch ohne signifikanten Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens. Aus diesem Grund hat diese Therapieform in der Zwischenzeit an Bedeutung verloren.

Eine Verringerung der Fernmetastasierung konnte hierdurch jedoch erreicht werden, wie in zwei metaanalytischen Auswertungen individueller Daten von 33 randomisierten Studien gezeigt werden konnte (108, 109).

Die Überlebensergebnisse bezüglich der verabreichten Cisplatinosis ergaben in der univariaten Analyse, dass die Gabe einer höheren Dosis an Cisplatin signifikant mit einem längeren Gesamtüberleben korreliert. Die multivariate Analyse hingegen ergab keine signifikante Korrelation zwischen Cisplatinosis und verlängertem Überleben.

Eine klinische Studie der Phase II/III untersuchte eine wöchentliche Gabe von 40 oder 100 mg/m² Cisplatin und zeigte eine Vergleichbarkeit des Gesamtüberlebens zwischen beiden Gruppen und einem besseren Nebenwirkungsprofil bei der Gabe 100 mg/m² (110).

Möglicherweise könnten größere Patientenkohorten zu mehr Erkenntnissen führen. Auch die Kontrolle bzw. das Erfassen von potenziellen Confoundern wie das Alter oder Komorbiditäten könnten hilfreich sein. Versterben Patienten während oder kurz nach der Therapie, ist es nicht immer einfach, die Todesursache eindeutig zu klären. Ist das - Versterben dem Tumor zuzuordnen oder liegt eine andere Ursache vor (z.B. bei einem 75-jährigen Patienten, der an einem Kopf-Hals-Tumor erkrankt und lebenslang geraucht und große Mengen Alkohol konsumiert hat, besteht auch ein Risiko an zahlreichen anderen Erkrankungen zu versterben.)?

Diesbezüglich müssen Confounder in randomisiert kontrollierten Studien effektiv gleichmäßig verteilt werden.

Patienten könnten während der Therapie umfassend über die Risiken des Rauchens aufgeklärt und auch bei der Raucherentwöhnung unterstützt werden, sodass eine individuelle Therapieabstimmung erfolgen kann (111).

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit war es das Ziel, die Bedeutung von Hypoxie und antitumorale Immunaktivität hinsichtlich des Überlebens nach primärer Radiochemotherapie bei verschiedenen Tumoren der Kopf-Hals-Region wie Oropharynx-, Hypopharynx-, Mundhöhlen- und Larynxkarzinomen, zu analysieren.

Das Ansprechen auf die Radiochemotherapie und die Chance, vollständig geheilt zu werden, erwiesen sich als individuell verschieden. Allerdings gibt es auch einen erheblichen Anteil von Patienten, bei denen keine Heilung erreicht wird – diese Faktoren galt es, mittels Detektion spezifischer Antigene wie Carboanhydrase-IX, CD73 und CD8+ T-Lymphozyten durch die tyraminbasierte Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung an Paraffin-Gewebeschnitten gleichzeitig in einem Präparat zu analysieren. Da die rein visuelle Beurteilung der Ergebnisse nicht quantitativ ist, wurde QuPath, eine Open-Source-Software zur Analyse der digitalisierten „Whole-Slide“-Scans, eingesetzt.

Auf der Grundlage der bereits bekannten Literatur wurde eine Überexpression von CD73 im hypoxischen Tumorgewebe mit einer Herabsetzung der Inhibition der Infiltration mit zytotoxischen T-Lymphozyten erwartet – dies hat sich so in dieser Arbeit nicht bewahrheitet. Es konnte kein relevanter Einfluss bzw. keine relevante Expression von CD73 gezeigt werden, und auch kein Zusammenhang zwischen tumorinfiltrierenden CD8+-T-Lymphozyten bestätigt werden, obwohl die besondere Stärke dieser Arbeit das große, primär mit Radiochemotherapie behandelte Kollektiv war.

Des Weiteren sollte eine größere Anzahl an Gewebeproben rekrutiert werden, um Ergebnisabweichungen bei Gewebheterogenität zu minimieren, da in diesem Probenkollektiv eine erhebliche Varianz bezüglich der Tumor- und Stromagröße vorlag. Möglicherweise war die Studie durch lymphatische Invasion limitiert, und eine relevante Effektdetektion war fehlerbehaftet.

In Zukunft wäre ein großer Vorteil, die Einschlusskriterien klar zu definieren und eine Datenerhebung mittels eines - wie oben bereits erwähnt - größeren Patientenkollektivs durchzuführen. Modernere Nachweismethoden könnten repräsentativere und damit aussagestarke Resultate besser veranschaulichen sowie auch die Problematik der Autofluoreszenz reduzieren.

Ein denkbarer Ansatz bei Patienten mit einem hohen hypoxischen Tumoranteil und niedrigem CD8-Anteil könnte eine Hypoxie Target Therapie sein, da bekanntermaßen die Tumorphoxie die Tumoraggressivität erhöht und die Strahlensensitivität herabsetzt.

7 Literaturverzeichnis

1. Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global epidemiology of head and neck cancers: a continuing challenge. *Oncology*. 2016;91(1):13-23.
2. Goldenberg D, Lee J, Koch WM, Kim MM, Trink B, Sidransky D, et al. Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*. 2004;131(6):986-93.
3. Leemans CR, Snijders PJ, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18(5):269-82.
4. Koch-Institut R. Krebs in Deutschland für 2013/2014. Robert Koch-Institut; 2017.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
6. Cramer JD, Burtness B, Le QT, Ferris RL. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2019;16(11):669-83.
7. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(4):266-76.
8. Bredell MG, Ernst J, El-Kochairi I, Dahlem Y, Ikenberg K, Schumann DM. Current relevance of hypoxia in head and neck cancer. *Oncotarget*. 2016;7(31):50781-804.
9. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Schreiber TH, Belikoff B, Abbott R, et al. Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Science translational medicine*. 2015;7(277):277ra30-ra30.
10. Gerdes MJ, Sevinsky CJ, Sood A, Adak S, Bello MO, Bordwell A, et al. Highly multiplexed single-cell analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(29):11982-7.
11. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut; 2016.
12. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 1985;314(6006):111-4.
13. Ruutu M, Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Transcriptional profiling of a human papillomavirus 33–positive squamous epithelial cell line which acquired a selective growth advantage after viral integration. *International journal of cancer*. 2002;100(3):318-26.
14. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews cancer*. 2002;2(5):342-50.
15. Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head and neck pathology*. 2012;6:3-15.
16. Lindel K, de Villiers E-M, Burri P, Studer U, Altermatt HJ, Greiner RH, et al. Impact of viral E2-gene status on outcome after radiotherapy for patients with human papillomavirus 16–positive cancer of the uterine cervix. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2006;65(3):760-5.
17. Olthof NC, Huebbers CU, Kolligs J, Henfling M, Ramaekers FC, Cornet I, et al. Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E207-E18.
18. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case–control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(19):1944-56.

19. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, Chaturvedi AK, D'Souza G, Gravitt PE, et al. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9–10, 2008, Washington, DC. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*. 2009;31(11):1393-422.
20. Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S, et al. HPV involvement in head and neck cancers: comprehensive assessment of biomarkers in 3680 patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108(6):djv403.
21. Wittekindt C, Wagner S, Bushnak A, Prigge E-S, von Knebel Doeberitz M, Würdemann N, et al. Increasing incidence rates of oropharyngeal squamous cell carcinoma in Germany and significance of disease burden attributed to human papillomavirus. *Cancer prevention research*. 2019;12(6):375-82.
22. Blomberg M, Nielsen A, Munk C, Kjaer SK. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978–2007: focus on human papillomavirus associated sites. *International journal of cancer*. 2011;129(3):733-41.
23. Rischin D, Young RJ, Fisher R, Fox SB, Le Q-T, Peters LJ, et al. Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *Journal of clinical oncology*. 2010;28(27):4142.
24. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus–positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(4):261-9.
25. Taberna M, Mena M, Pavón M, Alemany L, Gillison M, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Annals of Oncology*. 2017;28(10):2386-98.
26. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews cancer*. 2011;11(1):9-22.
27. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*. 2002;21(10):1510-7.
28. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(1):24-35.
29. Stögbauer F, Beck S, Ourailidis I, Hess J, Poremba C, Lauterbach M, et al. Tumour budding-based grading as independent prognostic biomarker in HPV-positive and HPV-negative head and neck cancer. *British Journal of Cancer*. 2023;128(12):2295-306.
30. Almangush A, Pirinen M, Heikkinen I, Mäkitie AA, Salo T, Leivo I. Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *British journal of cancer*. 2018;118(4):577-86.
31. Okuyama K, Fukushima H, Naruse T, Yanamoto S, Tsuchihashi H, Umeda M. CD44 variant 6 expression and tumor budding in the medullary invasion front of mandibular gingival squamous cell carcinoma are predictive factors for cervical lymph node metastasis. *Pathology & Oncology Research*. 2019;25:603-9.
32. Rossi S, Baili P, Capocaccia R, Caldora M, Carrani E, Minicozzi P, et al. The EURO CARE-5 study on cancer survival in Europe 1999–2007: Database, quality checks and statistical analysis methods. *European journal of cancer*. 2015;51(15):2104-19.
33. Guntinas-Lichius O, Wendt T, Buentzel J, Esser D, Lochner P, Mueller A, et al. Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian

- cancer registration database. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2010;136:55-63.
34. Mehanna H, West C, Nutting C, Paleri V. Head and neck cancer—Part 2: Treatment and prognostic factors. *Bmj*. 2010;341.
35. Rudolph E, Dyckhoff G, Becher H, Dietz A, Ramroth H. Effects of tumour stage, comorbidity and therapy on survival of laryngeal cancer patients: a systematic review and a meta-analysis. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2011;268:165-79.
36. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(19):1937-44.
37. Mantravadi RV, Haas RE, Skolnik EM, Liebner EJ, Applebaum EL. Postoperative radiotherapy for persistent tumor at the surgical margin in head and neck cancers. *The Laryngoscope*. 1983;93(10):1337-40.
38. Paleri V, Wight RG, Silver CE, Haigentz M, Jr., Takes RP, Bradley PJ, et al. Comorbidity in head and neck cancer: a critical appraisal and recommendations for practice. *Oral Oncol*. 2010;46(10):712-9.
39. Salazar CR, Anayannis N, Smith RV, Wang Y, Haigentz Jr M, Garg M, et al. Combined P16 and human papillomavirus testing predicts head and neck cancer survival. *International journal of cancer*. 2014;135(10):2404-12.
40. Salazar CR, Smith RV, Garg MK, Haigentz M, Schiff BA, Kawachi N, et al. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma survival: a comparison by tumor site and initial treatment. *Head and neck pathology*. 2014;8:77-87.
41. Sethi S, Ali-Fehmi R, Franceschi S, Struijk L, van Doorn LJ, Quint W, et al. Characteristics and survival of head and neck cancer by HPV status: a cancer registry-based study. *International journal of cancer*. 2012;131(5):1179-86.
42. Chakravarthy A, Henderson S, Thirdborough SM, Ottensmeier CH, Su X, Lechner M, et al. Human papillomavirus drives tumor development throughout the head and neck: improved prognosis is associated with an immune response largely restricted to the oropharynx. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(34):4132.
43. Fakhry C, Westra WH, Wang SJ, van Zante A, Zhang Y, Rettig E, et al. The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer*. 2017;123(9):1566-75.
44. Zhang L, Chen H. Increased vascular endothelial growth factor expression predicts a worse prognosis for laryngeal cancer patients: a meta-analysis. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2017;131(1):44-50.
45. Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiotherapy and oncology*. 2005;77(1):18-24.
46. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007;26:225-39.
47. Vaupel P, editor *Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology*. Seminars in radiation oncology; 2004: Elsevier.
48. Kimura H, Braun RD, Ong ET, Hsu R, Secomb TW, Papahadjopoulos D, et al. Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer research*. 1996;56(23):5522-8.

49. Nagy J, Chang SH, Dvorak AM, Dvorak HF. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British journal of cancer*. 2009;100(6):865-9.
50. Fukumura D, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvascular research*. 2007;74(2-3):72-84.
51. di Tomaso E, Capen D, Haskell A, Hart J, Logie JJ, Jain RK, et al. Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer research*. 2005;65(13):5740-9.
52. Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae S-S, Booth MF, Garkavtsev I, et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer cell*. 2004;6(6):553-63.
53. Mayer A, Zahnreich S, Brieger J, Vaupel P, Schmidberger H. Downregulation of EGFR in hypoxic, diffusion-limited areas of squamous cell carcinomas of the head and neck. *British Journal of Cancer*. 2016;115(11):1351-8.
54. Konerding M, Fait E, Gaumann A. 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *British journal of cancer*. 2001;84(10):1354-62.
55. Kuś J, Miodoński A, Olszewski E, Tyrankiewicz R. Morphology of arteries, veins, and capillaries in cancer of the larynx: scanning electron-microscopical study on microcorrosion casts. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1981;100(3):271-83.
56. Tas F, Eralp Y, Basaran M, Sakar B, Alici S, Argon A, et al. Anemia in oncology practice: relation to diseases and their therapies. *American journal of clinical oncology*. 2002;25(4):371-9.
57. Spivak JL. The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(7):543-55.
58. Plawny L. Point of view about new guidelines on ESAs (erythropoiesis-stimulating agents). *Belgian Journal of Hematology Volume*. 2012;3(3):8-.
59. Kopp H-G, Krauss K, Fehm T, Staebler A, Zahm J, Vogel W, et al. Symptomatic bone marrow involvement in breast cancer—clinical presentation, treatment, and prognosis: a single institution review of 22 cases. *Anticancer research*. 2011;31(11):4025-30.
60. Feelders, Vreugdenhil, Eggermont, Eijk V, Swaak. Regulation of iron metabolism in the acute-phase response: interferon γ and tumour necrosis factor α induce hypoferraemia, ferritin production and a decrease in circulating transferrin receptors in cancer patients. *European journal of clinical investigation*. 1998;28(7):520-7.
61. Höckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schäffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer research*. 1996;56(19):4509-15.
62. Höckel M, Schlenger K, Höckel S, Aral B, Schäffer U, Vaupel P. Tumor hypoxia in pelvic recurrences of cervical cancer. *International journal of cancer*. 1998;79(4):365-9.
63. Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pålman S, editors. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells—a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Seminars in cell & developmental biology*; 2005: Elsevier.
64. Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods in enzymology*. 381: Elsevier; 2004. p. 335-54.

65. Cuvier C, Jang A, Hill R. Exposure to hypoxia, glucose starvation and acidosis: effect on invasive capacity of murine tumor cells and correlation with cathepsin (L+ B) secretion. *Clinical & experimental metastasis*. 1997;15:19-25.
66. Hockel M, Schlenger K, Hockel S, Vaupel P. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer research*. 1999;59(18):4525-8.
67. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer research*. 1996;56(5):941-3.
68. Rofstad E. Microenvironment-induced cancer metastasis. *International journal of radiation biology*. 2000;76(5):589-605.
69. Subarsky P, Hill RP. The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression. *Clinical & experimental metastasis*. 2003;20:237-50.
70. Giaccia AJ, editor *Hypoxic stress proteins: survival of the fittest*. Seminars in radiation oncology; 1996: Elsevier.
71. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Medical oncology*. 2001;18:243-59.
72. Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist*: Philadelphia; 2006.
73. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott O. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology*. 1953;26(312):638-48.
74. Horsman MR, Overgaard J. The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy. *Journal of radiation research*. 2016;57(S1):i90-i8.
75. Ewing D. The oxygen fixation hypothesis: a reevaluation. *American journal of clinical oncology*. 1998;21(4):355-61.
76. Walker LJ, Craig RB, Harris AL, Hickson ID. A role for the human DNA repair enzyme HAP1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress. *Nucleic Acids Research*. 1994;22(23):4884-9.
77. Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Experimental cell research*. 1996;223(1):163-70.
78. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *nature*. 1996;379(6560):88-91.
79. Kim CY, Tsai MH, Osmanian C, Graeber TG, Lee JE, Giffard RG, et al. Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. *Cancer research*. 1997;57(19):4200-4.
80. Zhivotovsky B, Joseph B, Orrenius S. Tumor radiosensitivity and apoptosis. *Experimental cell research*. 1999;248(1):10-7.
81. Boucher Y, Baxter LT, Jain RK. Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer research*. 1990;50(15):4478-84.
82. Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annual review of biomedical engineering*. 2014;16:321-46.
83. Chang Q, Ornatsky OI, Siddiqui I, Straus R, Baranov VI, Hedley DW. Biodistribution of cisplatin revealed by imaging mass cytometry identifies extensive collagen binding in tumor and normal tissues. *Scientific reports*. 2016;6(1):36641.
84. Tafreshi NK, Lloyd MC, Bui MM, Gillies RJ, Morse DL. Carbonic anhydrase IX as an imaging and therapeutic target for tumors and metastases. *Subcell Biochem*. 2014;75:221-54.
85. Zatovicova M, Sedlakova O, Svastova E, Ohradanova A, Ciampor F, Arribas J, et al. Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a

- metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br J Cancer*. 2005;93(11):1267-76.
86. Innocenti A, Vullo D, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Interactions of phenols with the 12 catalytically active mammalian isoforms (CA I–XIV). *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2008;18(5):1583-7.
87. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(6):567-78.
88. Kijani S, Yrlid U, Heyden M, Levin M, Borén J, Fogelstrand P. Filter-dense multicolor microscopy. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119499.
89. Haist M, Kaufmann J, Kur I-M, Zimmer S, Grabbe S, Schmidberger H, et al. Response to primary chemoradiotherapy of locally advanced oropharyngeal carcinoma is determined by the degree of cytotoxic T cell infiltration within tumor cell aggregates. *Frontiers in Immunology*. 2023;14:1070203.
90. Angelo M, Bendall SC, Finck R, Hale MB, Hitzman C, Borowsky AD, et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. *Nature medicine*. 2014;20(4):436-42.
91. Ljungkvist AS, Bussink J, Kaanders JHAM, van Der Kogel AJ. Dynamics of tumor hypoxia measured with bioreductive hypoxic cell markers. *Radiation research*. 2007;167(2):127-45.
92. Mayer A, Höckel M, Vaupel P. Carbonic anhydrase IX expression and tumor oxygenation status do not correlate at the microregional level in locally advanced cancers of the uterine cervix. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(20):7220-5.
93. Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(8):1433-43.
94. Barthels JE. Analyse der Interaktion von T-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten auf Gewebeschnitten primärer Melanome, assoziierter Metastasen sowie korrespondierender melanozytärer Naiv 2021.
95. Abel J. Auswirkungen des Ernährungszustandes bei Kopf-Hals-Tumorpatient: innen unter Radio-(Chemo-) Therapie: Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky; 2023.
96. Fazel A, Quabius ES, Fabian A, Donate MG, Schleicher T, Kress K, et al. Eine Änderung des Rauchverhaltens beeinflusst das Überleben von HNSCC-Patienten. *Laryngo-Rhino-Otologie*. 2021;100(08):634-43.
97. Paleri V, Wight RG, Silver CE, Haigentz Jr M, Takes RP, Bradley PJ, et al. Comorbidity in head and neck cancer: a critical appraisal and recommendations for practice. *Oral oncology*. 2010;46(10):712-9.
98. Van der Bol JM, Mathijssen RH, Loos WJ, Friberg LE, van Schaik RH, de Jonge MJ, et al. Cigarette smoking and irinotecan treatment: pharmacokinetic interaction and effects on neutropenia. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(19):2719-26.
99. Browman GP, Wong G, Hodson I, Sathya J, Russell R, McAlpine L, et al. Influence of cigarette smoking on the efficacy of radiation therapy in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*. 1993;328(3):159-63.
100. Gillison ML, Zhang Q, Jordan R, Xiao W, Westra WH, Trotti A, et al. Tobacco smoking and increased risk of death and progression for patients with p16-positive and p16-negative oropharyngeal cancer. *Journal of clinical oncology*. 2012;30(17):2102-11.

101. Gritz ER, Fingeret MC, Vidrine DJ, Lazev AB, Mehta NV, Reece GP. Successes and failures of the teachable moment: smoking cessation in cancer patients. *Cancer*. 2006;106(1):17-27.
102. Rugg T, Saunders MI, Dische S. Smoking and mucosal reactions to radiotherapy. *The British journal of radiology*. 1990;63(751):554-6.
103. Sanders O, Pathak S. Hypopharyngeal cancer. *StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing*; 2022.
104. Chan KCA, Woo JKS, King A, Zee BCY, Lam WKJ, Chan SL, et al. Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(6):513-22.
105. Johnson DE, Burtneess B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature reviews Disease primers*. 2020;6(1):92.
106. Vordermark D, Brown JM. Endogene Tumorphoxiemarker: Indikatoren klinischer Strahlenresistenz? Predictors of Clinical Radiation Resistance? *Strahlentherapie und Onkologie*. 2003;179:801-11.
107. Vaupel P, Höckel M. Tumor oxygenation and its relevance to tumor physiology and treatment. *Oxygen Transport To Tissue XXIII: Oxygen Measurements in the 21st Century: Basic Techniques and Clinical Relevance: Springer*; 2003. p. 45-9.
108. Ma J, Liu Y, Huang X-L, Zhang Z-Y, Myers JN, Neskey DM, et al. Induction chemotherapy decreases the rate of distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma but does not improve survival or locoregional control: a meta-analysis. *Oral oncology*. 2012;48(11):1076-84.
109. Budach W, Bölke E, Kammers K, Gerber PA, Orth K, Gripp S, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC): a meta-analysis of randomized trials. *Radiotherapy and Oncology*. 2016;118(2):238-43.
110. Mohamed A, Twardy B, Zordok MA, Ashraf K, Alkhoder A, Schrapp K, et al. Concurrent chemoradiotherapy with weekly versus triweekly cisplatin in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: Comparative analysis. *Head & Neck*. 2019;41(5):1490-8.
111. Gritz ER, Dresler C, Sarna L. Smoking, the missing drug interaction in clinical trials: ignoring the obvious. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2005;14(10):2287-93.

8 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], für die freundliche Übernahme meiner Dissertation, die entscheidende Unterstützung bei der Fertigstellung sowie die Möglichkeit meine Arbeit [REDACTED] am Institut für Radioonkologie und Strahlentherapie der Universitätsmedizin Mainz abschließen zu dürfen. Ebenso bedanke ich mich für die unglaublich schnelle Endkorrektur.

Ich möchte mich außerdem besonders bei [REDACTED] bedanken, [REDACTED] meiner Dissertation zu übernehmen. Ich weiß die wertvolle Zeit und das Interesse an meiner Arbeit sehr zu schätzen.

Meinen großen Dank möchte ich [REDACTED] für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung – sowie für die zahlreichen motivierenden Gespräche - und [REDACTED] für die enorme Unterstützung, das Korrekturlesen und die sehr große Hilfe bei den statistischen Untersuchungen aussprechen.

Außerdem möchte ich [REDACTED] meinen herzlichen Dank für Ihre Unterstützung und Motivation ausdrücken.

Herzlichsten Dank [REDACTED] für euer Vertrauen und Freundschaft.

Mein inniger Dank gilt [REDACTED] für seine wundervolle Freundschaft und seinen Beistand.

Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank [REDACTED] für Ihre stets freundliche und zuverlässige Hilfe während meiner gesamten Arbeit.

Ich möchte an dieser Stelle meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Hamit und Ayse Fatma Yurbas, denen ich diese Arbeit widme, und Nursen meinen tiefsten Dank für Ihre unermüdliche Unterstützung und Ihren Glauben an mich aussprechen.

9 Tabellarischer Lebenslauf

Rastatt, 14.10.2024