

Aus dem Medizinischen Zentrum
für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Boris A. Stuck
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Assoziation von HNSCC-assoziierten Markern mit klinisch-
pathologischen Merkmalen – eine immunhistochemische
Analyse**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Marie Kronen, geb. Meinold
aus Kassel

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
10.11.2021.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Denise Hilfiker - Kleiner
Referent: Herr Prof. Dr. med. Robert Mandic
1. Korreferent: Herr Prof. Dr. rer. nat. Michael Bette

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	3
III. TABELLENVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	5
1.1 Kopf-Hals-Karzinome	5
1.1.1 Risikofaktoren	6
1.2 Tumorentstehung	7
1.3 Chemotherapieresistenz, am Beispiel von Cisplatin und seinen Analoga	9
1.4 ABC-Transporter und ihre Rolle bei der Chemotherapieresistenz.....	11
1.5 Tumorstammzellen und ihre Bedeutung für die Chemotherapieresistenz..	14
1.6 Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe und Motivation	16
2 MATERIAL	19
2.1 Patientengewebe.....	19
2.1.1 Kontrollgewebe	19
2.2 Technische Ausrüstung und Geräte	19
2.3 Verbrauchsmaterialien	20
2.4 Reagenzien	20
2.5 Primäre Antikörper	21
2.6 Sekundäre Antikörper.....	21
2.7 Puffer und Lösungen	22
3 METHODEN.....	23
3.1 Definition des Patientenkollektivs	23

3.2	Retrospektive Klinikdaten-Recherche	24
3.2.1	Lokalisation	24
3.2.2	Differenzierungsgrad bzw. Grading.....	25
3.2.3	TNM	25
3.2.4	Therapie.....	25
3.2.5	Rauchen.....	26
3.2.6	Alkohol	26
3.2.7	HPV.....	26
3.2.8	Rezidiv	26
3.3	Entscheidungsalgorithmus zur Auswahl des Kollektivs	28
3.4	Immunhistochemie nach der ABC-Methode	29
3.5	Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen	30
3.6	Statistische Analyse	32
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	33
4.1	Betrachtung des Kollektivs	33
4.1.1	Alter.....	35
4.1.2	Geschlecht	37
4.1.3	Rauchen, Alkohol und HPV Status.....	37
4.1.3.1	Tabakkonsum	38
4.1.3.2	Alkohol-Anamnese	38
4.1.3.3	HPV Status	38
4.1.4	TNM und Grading.....	39
4.1.4.1	Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors (T)	40
4.1.4.2	Regionäre Metastasierung (N).....	40
4.1.4.3	Fernmetastasierung (M)	41
4.1.4.4	Differenzierungsgrad (G)	41
4.1.5	Lokalisation	41
4.1.6	Rezidive	43
4.1.7	Vortherapie mittels Radio-, Chemo- bzw. Radiochemotherapie.....	45
4.1.8	Kontrollen	45
4.2	Immunhistochemische Analysen: Kandidatenproteine und Korrelation mit Klinikdaten.....	48
4.2.1	ABCC2	49
4.2.1.1	ABCC2 – Expression positiv/negativ	50
4.2.1.2	ABCC2 – Expression in HNSCC und Geschlecht der Patienten	51
4.2.1.3	ABCC2 – Expression in HNSCC und Alter der Patienten	52
4.2.1.4	ABCC2 – Expression in HNSCC und Tumorlokalisierung	52

4.2.1.5	ABCC2 – Expression in HNSCC und Grading.....	53
4.2.1.6	ABCC2 – Expression in HNSCC und N-Stadium.....	54
4.2.1.7	ABCC2 – Expression in HNSCC und T-Stadium.....	55
4.2.1.8	ABCC2 – Expression in HNSCC und Expression der übrigen Marker	56
4.2.2	ABCG2.....	61
4.2.2.1	ABCG2 – Expression positiv/negativ	63
4.2.2.2	ABCG2 – Expression in HNSCC und Geschlecht	63
4.2.2.3	ABCG2 – Expression in HNSCC und Alter	64
4.2.2.4	ABCG2 – Expression in HNSCC und Tumorlokalisation	65
4.2.2.5	ABCG2 – Expression in HNSCC und Grading.....	66
4.2.2.6	ABCG2 – Expression in HNSCC und N-Stadium	67
4.2.2.7	ABCG2 – Expression in HNSCC und T-Stadium.....	67
4.2.2.8	ABCG2 – Expression in HNSCC und Expression der übrigen Marker	68
4.2.3	Zytokeratin 19 (CK19).....	71
4.2.3.1	CK19 – Expression positiv/negativ	73
4.2.3.2	CK19 – Expression in HNSCC und T-Stadium.....	75
4.2.3.3	CK19 – Expression in HNSCC und N-Stadium.....	76
4.2.3.4	CK19 – Expression in HNSCC und Grading.....	77
4.2.3.5	CK19 – Expression in HNSCC und Korrelation mit klinischen Parametern – Fazit	78
4.2.4	Ki-67.....	80
4.2.4.1	Ki-67 – Expression positiv/negativ	82
4.2.4.2	Ki-67 – Expression in HNSCC und T-Stadium.....	85
4.2.4.3	Ki-67 – Expression in HNSCC und N-Stadium.....	85
4.2.4.4	Ki-67 – Expression in HNSCC und Grading	86
4.2.4.5	Ki-67 – Expression in HNSCC und Korrelation mit klinischen Parametern – Fazit	88
4.2.5	p53.....	90
4.2.5.1	p53 – Expression positiv/negativ	91
4.2.5.2	p53 – Expression in HNSCC und Alter	92
4.2.5.3	p53 – Expression in HNSCC und T-Stadium.....	92
4.2.5.4	p53 – Expression in HNSCC und N-Stadium.....	93
4.2.5.5	p53 – Expression in HNSCC und Grading.....	93
4.2.5.6	p53 – Expression in HNSCC und Korrelation mit klinischen Parametern – Fazit	94
4.2.6	HNSCC mit Co-Expression von Ki-67, p53 +/-, CK19, ABCC2 und ABCG2	97
4.2.6.1	Vergleich von HNSCC mit Co-Expression von Ki-67, CK19, ABCG2 und ABCC2 Score 0-3 vs. Score \geq 4	97
4.2.6.2	Vergleich von HNSCC mit Co-Expression aller Marker, einschließlich p53	99
4.2.7	Vergleich Rezidiv und Primarius	102
4.2.7.1	Rezidiv vs. Primarius: ABCC2 Expression.....	102
4.2.7.2	Rezidiv vs. Primarius: ABCG2 Expression	102

4.2.7.3	Rezidiv vs. Primarius: CK19 Expression.....	103
4.2.7.4	Rezidiv vs. Primarius: Ki-67 Expression	103
4.2.7.5	Rezidiv vs. Primarius: p53 Expression.....	103
4.2.7.6	Rezidiv vs. Primarius – Fazit	103
4.2.8	Vorbehandlung mittels (Radio-) Chemotherapie	104
4.2.9	Conclusio	105
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
6	SUMMARY	111
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	113
8	TABELLARISCHER ANHANG.....	135
9	GRAPHISCHER ANHANG	165
10	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER*INNEN.....	178
11	DANKSAGUNG.....	179

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABCC2	ATP-binding Cassette sub-family C member 2 (Synonym: cMOAT, MRP2)
ABCG2	ATP-binding Cassette sub-family G member 2 (Synonym: BCRP)
ABC-Methode	(Strept)Avidin-Biotin-Complex-Methode: Avidin (oder Streptavidin) bindet einen biotinylierten sekundären Antikörper, der eine Meerrettichperoxidase-reaktion katalysiert.
ABC-Transporter	ATP-binding-Cassette-Transporter
a. d.	<i>aqua destillata</i> (lat.), destilliertes Wasser
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Arbeitszeichen
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
CDDP	<i>cis-diamminedichloroplatinum(II)</i> (engl.), Cisplatin
CK19	Cytokeratin 19
cMOAT	<i>canalicular multispecific organic anion transporter 1</i> (engl.)
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> (engl.), Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
cp	zytoplasmatisch
CSC	<i>Cancer stem cells</i> (engl.), Tumorstammzellen
CTR1	<i>copper transporter receptor 1</i> (engl.), Haupt-Kupfer-Influx-Transporter, Influx-Transporter von CDDP, relevante Rolle bei der Platin-Resistenz
DAB	3,3'-Diaminobenzidin, Indikator, braunes Endprodukt bei der Immunhistochemie
ED	Erstdiagnose
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (engl.)
EKK	Ethikkommission
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (engl.), Durchflusszytometrie
FB	Fachbereich
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (engl.)
G	<i>Grading</i> , Differenzierungsgrad
GEKID	Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
ggf.	gegebenenfalls
HCl	Chlorwasserstoffsäure, Salzsäure
HNO	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
HNSCC	<i>Head and neck squamous-cell carcinoma</i> (engl.), Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs
HPH	Hypopharynx
HPV	humane Papillomaviren
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (engl.), Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IRS	Immunreaktiver Score
J.	Jahre
K	Kontrolle
k. A.	keine Angabe
Ki-67	Protein, Marker der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation (Ki - Kiel)
KIS	Krankenhausinformationssystem, Klinikinformationssystem

LAR	Larynx
LC	<i>Lung cancer</i> (engl.), Lungenkrebs, Bronchialkarzinom
LSCC	<i>laryngeal squamous cell carcinoma</i> (engl.) Larynxkarzinom
m	membranständig, membranär
M	Metastasen, Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen
MDR	<i>multi drug resistance</i> (engl.), Multiresistenz
MRP	<i>multi drug resistance-associated protein</i> (engl.)
MUH	Mundhöhle
n	je nach Kontext Anzahl Fälle bzw. Hinweis auf nukleäre Lokalisation des Kandidatenproteins
N	je nach Kontext Nodus (<i>Nodus lymphoideus</i> (lat.)), Fehlen bzw. Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen bzw. Anzahl Fälle
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NLS	(C-terminales) nukleäres Lokalisationssignal
NPH	Nasopharynx
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
OPH	Oropharynx
OSCC	<i>oral squamous cell carcinoma</i> (engl.), Oropharynxkarzinom, oropharyngeales SCC
p53	Tumorsuppressor Protein p53, löst als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind, aus
Path-Nummer	Pathologie-Nummer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE-Ca	Plattenepithelkarzinom
PHA	Pharynx
PP	Prozentpunkte, Anteil des positiv-gefärbten Tumors, Prozentsatz positiver Tumorzellen/Tumormasse
RCT	Radiochemotherapie
Rel./rel.	<i>release, released</i> (engl.), Veröffentlichung, veröffentlicht
RKI	Robert Koch-Institut
S.	Seite
s. a.	siehe auch
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> (engl.), Plattenepithelkarzinom
SI	<i>staining intensity</i> (engl.), Farbintensität
SP	<i>Side Population</i> (engl.)
STABW	Standardabweichung
T	Tumor, Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (engl.)
TIC	<i>tumor initiating cells</i> (engl.), Tumor-initierende Zellen, Tumorstammzellen
(p)TNM	(pathologische)TNM-Klassifikation zur Einteilung von malignen Tumoren
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1. FLUSSDIAGRAMM: HNSCC – GEWINNUNG DES KOLLEKTIVS	28
ABBILDUNG 2. IMMUNREAKTIVER SCORE (IRS) - ERGEBNISSE UND BEWERTUNGSGRUPPEN.....	31
ABBILDUNG 3. ALTERSVERTEILUNG IM PATIENTENKOLLEKTIV	35
ABBILDUNG 4. GESCHLECHTERVERTEILUNG IM PATIENTENKOLLEKTIV	37
ABBILDUNG 5. ERHEBUNGEN IM PATIENTENKOLLEKTIV ZU TABAKKONSUM, ALKOHOLKONSUM UND HPV-STATUS	38
ABBILDUNG 6. KLASSIFIKATION DER TUMORGRÖßEN-VERTEILUNG (T1-4)	40
ABBILDUNG 7. AUFTRETEN VON REGIONÄREN METASTASEN (N), FERNMETASTASEN (M) UND DIFFERENZIERUNGSGRAD (G)	41
ABBILDUNG 8. VERTEILUNG DER KOPF-HALSKARZINOME ENTSPRECHEND IHRER ANATOMISCH-TOPOGRAPHISCHEN LAGE	42
ABBILDUNG 9. VERTEILUNG DER LOKALISATIONEN/ENTITÄTEN IM PATIENTENKOLLEKTIV.....	43
ABBILDUNG 10. VERTEILUNG VON REZIDIV UND PRIMARIUS IM PATIENTENKOLLEKTIV.....	44
ABBILDUNG 11. ALTERSVERTEILUNG IM KONTROLLKOLEKTIV	46
ABBILDUNG 12. EXEMPLARISCHE DARSTELLUNGEN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE FÜR ABCC2.....	49
ABBILDUNG 13. ABCC2 EXPRESSION – HNSCC VS. KONTROLLEN	50
ABBILDUNG 14. ABCC2 EXPRESSION – KORRELATION MIT DIFFERENZIERUNGSGRAD G.....	53
ABBILDUNG 15. ABCC2 EXPRESSION – KORRELATION MIT T-STADIUM.....	55
ABBILDUNG 16. ABCC2 EXPRESSION IN CK19+ HNSCC UND CK19+ KONTROLLEN	56
ABBILDUNG 17. ABCC2 EXPRESSION IN Ki-67+ HNSCC UND Ki-67+ KONTROLLEN	57
ABBILDUNG 18. ABCC2 EXPRESSION IN HNSCC UND KONTROLLEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DES P53-STATUS	59
ABBILDUNG 19. EXEMPLARISCHE DARSTELLUNGEN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE FÜR ABCG2	62
ABBILDUNG 20. ABCG2 EXPRESSION – HNSCC VS. KONTROLLEN.....	63
ABBILDUNG 21. ABCG2 EXPRESSION IN CK19+ HNSCC UND CK19+ KONTROLLEN	68
ABBILDUNG 22. EXEMPLARISCHE DARSTELLUNGEN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE FÜR CK19	72
ABBILDUNG 23. CK19 EXPRESSION – HNSCC VS. KONTROLLEN.....	73
ABBILDUNG 24. CK19 EXPRESSION – KORRELATION MIT T-STADIUM	75
ABBILDUNG 25. CK19 EXPRESSION – KORRELATION MIT N-STADIUM	76
ABBILDUNG 26. CK19 EXPRESSION – KORRELATION MIT DIFFERENZIERUNGSGRAD G	77
ABBILDUNG 27. EXEMPLARISCHE DARSTELLUNGEN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE FÜR Ki-67	81
ABBILDUNG 28. Ki-67 EXPRESSION – HNSCC VS. KONTROLLEN.....	82
ABBILDUNG 29. Ki-67 SCORE >3 VS. 0-3 – HNSCC VS. KONTROLLEN	83
ABBILDUNG 30. Ki-67 EXPRESSION – KORRELATION MIT DIFFERENZIERUNGSGRAD G	86
ABBILDUNG 31. Ki-67 SCORE >3 VS. SCORE 0-3 – KORRELATION MIT G.....	87
ABBILDUNG 32. EXEMPLARISCHE DARSTELLUNGEN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE FÜR P53.....	90
ABBILDUNG 33. P53 EXPRESSION – HNSCC VS. KONTROLLEN	91
ABBILDUNG 34. Ki-67/CK19/ABCG2/ABCC2 SCORE 0-3 VS. SCORE ≥4	98
ABBILDUNG 35. ALLE MARKER + P53 SCORE 0-3 VS. ≥4 VS. Ki-67/CK19/ABCG2/ABCC2 ≥4/P53 SCORE 0-3.....	101
ABBILDUNG 36. ABCC2 EXPRESSION – KORRELATION MIT GESCHLECHT	165
ABBILDUNG 37. ABCC2 EXPRESSION – KORRELATION MIT ALTER BEI ED	166
ABBILDUNG 38. ABCC2 EXPRESSION – KORRELATION MIT TUMORLOKALISATION	166
ABBILDUNG 39. ABCC2 EXPRESSION – KORRELATION MIT N-STADIUM	167
ABBILDUNG 40. ABCG2 EXPRESSION – KORRELATION MIT GESCHLECHT	167
ABBILDUNG 41. ABCG2 EXPRESSION – KORRELATION MIT ALTER BEI ERSTDIAGNOSE.....	168
ABBILDUNG 42. ABCG2 EXPRESSION – KORRELATION MIT TUMORLOKALISATION.....	168
ABBILDUNG 43. ABCG2 EXPRESSION – KORRELATION MIT DIFFERENZIERUNGSGRAD G	169
ABBILDUNG 44. ABCG2 EXPRESSION – KORRELATION MIT N-STADIUM.....	169
ABBILDUNG 45. ABCG2 EXPRESSION – KORRELATION MIT T-STADIUM	170
ABBILDUNG 46. ABCG2 EXPRESSION IN Ki-67+ HNSCC UND Ki-67+ KONTROLLEN	170
ABBILDUNG 47. ABCG2 EXPRESSION IN HNSCC UND KONTROLLEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DES P53-STATUS	171
ABBILDUNG 48. Ki-67 EXPRESSION – KORRELATION MIT T-STADIUM	171
ABBILDUNG 49. Ki-67 SCORE >3 VS. 0-3 – KORRELATION MIT T-STADIUM	172
ABBILDUNG 50. Ki-67 EXPRESSION – KORRELATION MIT N-STADIUM	172
ABBILDUNG 51. Ki-67 SCORE >3 VS. 0-3 – KORRELATION MIT N-STADIUM	172
ABBILDUNG 52. P53 EXPRESSION – KORRELATION MIT ERKRANKUNGSALTER	173
ABBILDUNG 53. P53 EXPRESSION – KORRELATION MIT T-STADIUM.....	173
ABBILDUNG 54. P53 EXPRESSION – KORRELATION MIT N-STADIUM.....	174
ABBILDUNG 55. P53 EXPRESSION – KORRELATION MIT DIFFERENZIERUNGSGRAD G.....	174
ABBILDUNG 56. Ki-67/CK19/ABCG2/ABCC2 SCORE 0-3 VS. ≥4, P53 +/-	175

ABBILDUNG 57. ABCC2 EXPRESSION – PRIMARIUS VS. REZIDIV	175
ABBILDUNG 58. ABCG2 EXPRESSION – PRIMARIUS VS. REZIDIV	176
ABBILDUNG 59. CK19 EXPRESSION – PRIMARIUS VS. REZIDIV	176
ABBILDUNG 60. KI-67 EXPRESSION – PRIMARIUS VS. REZIDIV	177
ABBILDUNG 61. P53 EXPRESSION – PRIMARIUS VS. REZIDIV	177

III. TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1. SEMIQUANTITATIVE BEURTEILUNG UND IMMUNREAKTIVER SCORE	31
TABELLE 2. CHARAKTERISTIKA DES PATIENTENKOLLEKTIVS (98 FÄLLE) - ÜBERSICHT	34
TABELLE 3. ALTERSGRUPPEN IM PATIENTENKOLLEKTIV.....	36
TABELLE 4. VERTEILUNG VON PRIMARIUS UND REZIDIV	44
TABELLE 5. VERTEILUNG DES MERKMALS VORTHERAPIE IM PATIENTENKOLLEKTIV.....	45
TABELLE 6. CHARAKTERISTIKA DER KONTROLL-KOHORTE – ÜBERSICHT	46
TABELLE 7. ABCC2 EXPRESSION IN HNSCC MIT KI-67 SCORE > 3 VS. SCORE 0-3	58
TABELLE 8. CK19 SCORE < 8 VS. 8-12 – HNSCC VS. KONTROLLEN.....	74
TABELLE 9. KI-67 SCORE > 3 VS. 0-3 – HNSCC VS. KONTROLLEN.....	83
TABELLE 10. GESAMTLISTE DER EINGESCHLOSSENEN PRÄPARATE.....	135
TABELLE 11. VERTEILUNG VON REZIDIV UND PRIMARIUS IM KOLLEKTIV	156
TABELLE 12. REZIDIVE UND PRIMARIEN – NICHT IN 98 FÄLLEN ENTHALTEN	156
TABELLE 13. ÜBERSICHT ÜBER DIE REZIDIV-PRIMARIUS-SETS.....	157
TABELLE 14. ABCC2 – ÜBERSICHTSTABELLE IMMUNHISTOCHEMIE KORRELATION – ANZAHL.....	158
TABELLE 15. NUKLEOZYTOPLASMATISCHE VERTEILUNG VON ABCC2	158
TABELLE 16. ABCG2 – ÜBERSICHTSTABELLE IMMUNHISTOCHEMIE KORRELATION – ANZAHL.....	159
TABELLE 17. NUKLEOZYTOPLASMATISCHE VERTEILUNG VON ABCG2	159
TABELLE 18. CK19 – ÜBERSICHTSTABELLE IMMUNHISTOCHEMIE KORRELATION – ANZAHL	160
TABELLE 19. NUKLEOZYTOPLASMATISCHE VERTEILUNG VON CK19.....	160
TABELLE 20. KI-67 – ÜBERSICHTSTABELLE IMMUNHISTOCHEMIE KORRELATION – ANZAHL.....	161
TABELLE 21. NUKLEOZYTOPLASMATISCHE VERTEILUNG VON P53	161
TABELLE 22. P53 – ÜBERSICHTSTABELLE IMMUNHISTOCHEMIE KORRELATION – ANZAHL	162
TABELLE 23. ABCG2 EXPRESSION IN HNSCC MIT KI-67 SCORE > 3 VS. 0-3.....	162
TABELLE 24. CK19 SCORE < 8 VS. 8-12 – KORRELATION MIT GRADING G.....	162
TABELLE 25. KI-67 SCORE > 3 VS. 0-3 – PRIMARIUS UND REZIDIV	163
TABELLE 26. ABCC2 EXPRESSION IN HNSCC – VERGLEICH VORTHERAPIE JA/NEIN – ANZAHL	163
TABELLE 27. ABCG2 EXPRESSION IN HNSCC – VERGLEICH VORTHERAPIE JA/NEIN – ANZAHL.....	163
TABELLE 28. KI-67 EXPRESSION IN HNSCC – VERGLEICH VORTHERAPIE JA/NEIN – ANZAHL.....	163
TABELLE 29. CK19 EXPRESSION IN HNSCC – VERGLEICH VORTHERAPIE JA/NEIN – ANZAHL.....	164
TABELLE 30. P53 EXPRESSION IN HNSCC – VERGLEICH VORTHERAPIE JA/NEIN – ANZAHL	164

1 EINLEITUNG

1.1 Kopf-Hals-Karzinome

Kopf-Hals-Karzinome zählen mit weltweit mehr als 830.000 Neuerkrankungen pro Jahr zu den häufigsten Tumoren beim Menschen [29]. In mehr als 90% der Fälle handelt es sich hierbei um Plattenepithelkarzinome (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, HNSCC). Die übrigen ca. 10% verteilen sich auf Adenokarzinome, Sarkome und seltenere Formen. Sie sind die achthäufigste Tumorentität bezogen auf die Inzidenz und mit ca. 430.000 Todesfällen pro Jahr, die siebthäufigste bezogen auf die Mortalität [29, 108, 166].

In Deutschland erkranken pro Jahr knapp 17.000 Patienten an Tumoren des Mund- und Rachenraums, einschließlich des Kehlkopfes. Seit der Jahrtausendwende nimmt die Inzidenz tendenziell leicht ab. Bei Frauen nahm sie zunächst deutlich zu und liegt nun seit 2011 auf einem ähnlichen Niveau, mit zuletzt angedeutet abfallender Tendenz [260, 262]. Ein Zusammenhang mit einer Änderung im Rauchverhalten ist naheliegend [250]. Die Sterberate zeigte in Deutschland bis 2010 insgesamt eine steigende Tendenz [260], zuletzt konnte aber ein leichter Rückgang der Sterberate für Männer und eine Stagnation für Frauen beobachtet werden [262]. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung liegt für Tumore des Mund- und Rachenraums für Frauen bei 63%, für Männern bei 47%. Larynxkarzinome weisen eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 61% für Männer und 63% für Frauen auf [262]. Über das letzte Jahrzehnt zeigen sich diese Daten im Wesentlichen unverändert (RKI-Daten 2007-2016 [258-262]). Auch international betrachtet, konnte in den letzten 30 Jahren, trotz zahlreicher Fortschritte in chirurgischen und konservativen Therapien, welche durch Erhalt der Organfunktion zu einer verbesserten Lebensqualität führen konnten [9-10], das Langzeitüberleben der Patienten nur gering verbessert werden [39, 175, 258-262]. Unspezifische Symptome im Frühstadium führen regelhaft zu einer späten Diagnosestellung in schon lokal fortgeschrittenem Stadium. Gemeinsam mit einer frühen lymphogenen Metastasierung führt dies zu einer schlechten Prognose [204] und dem Bedarf multimodaler Therapieansätze. Neue Erkenntnisse in der Karzinogenese brachten neue therapeutische Angriffspunkte, so wurde mittels Kinaseinhibitoren (Erlotinib und Gefitinib) und Antikörpern gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*), wie Cetuximab und Panitumumab versucht das *Outcome* für die Patienten zu verbessern. Jedoch konnten bezüglich des Langzeitüberlebens auch hierdurch keine wesentlichen

Verbesserungen erreicht werden [182]. Weiterhin bleiben die Radio- und die Chemotherapie mit Cisplatin und seinen Derivaten bedeutende therapeutische Säulen nach Ausschöpfen chirurgischer Maßnahmen. Die Hauptgründe für die Mortalität sind ein Rezidiv, eine Metastasierung sowie das fehlende Ansprechen auf eine Chemotherapie [9, 215]. Um die Therapie und das *Outcome* der Patienten zu optimieren, bedarf es eines besseren Verständnisses der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen sowie der einer Metastasierung und Therapieresistenz zugrunde liegenden Mechanismen.

1.1.1 *Risikofaktoren*

Es ist gut untersucht, dass Alkohol- und Tabakabusus, die Hauptrisikofaktoren in der Kanzerogenese von Kopf-Hals-Karzinomen darstellen. Ca. 75% der HNSCC lassen sich ätiologisch mit den Noxen Alkohol und Tabak (Rauch- oder Kautabak) in Verbindung bringen [215]. Das Risiko ein HNSCC zu entwickeln ist bei schweren Rauchern und Alkoholabhängigen bzw. einem Mindestkonsum von 3 oder mehr alkoholischen Getränken pro Tag um das drei- bis neunfache erhöht. Ein kombinierter Abusus erhöht das Risiko um den Faktor 100 [158, 232]. Mundhöhlenkarzinome und Pharynxkarzinome stehen stärker mit einem Alkoholabusus in Zusammenhang, wohingegen Larynxkarzinome stärker mit dem Risikofaktor Rauchen assoziiert werden [57]. Zusätzlich spielt eine genetische Disposition eine Rolle: Für Verwandte 1. Grades ist das Risiko selbst ein HNSCC zu entwickeln um den Faktor 1,7 erhöht [147-148]. In den letzten 2 Jahrzehnten zeigt sich eine Veränderung des Rauchverhaltens, was sich seit 2011 auch in Deutschland in einem Rückgang der Inzidenz der Kopf-Hals-Karzinome bemerkbar macht [250]. Auch die Inzidenz der Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome ging seit 2011 nach einem langjährigen Anstieg bei Frauen und einem stabilen Wert bei Männern nun jährlich um etwa 3% zurück [250].

Für Oropharynxkarzinome ist zudem eine Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) als Risikofaktor sehr relevant, in 90% der Fälle durch den Subtyp HPV-16 [83]. Das Virus induziert in den betroffenen Epithelzellen einen Funktionsverlust von zellulären Proteinen, die eine wichtige Bedeutung für Kontrollmechanismen von Zellwachstum, DNA-Reparatur und Apoptose haben, wodurch eine maligne Transformation begünstigt wird [232]. In den USA werden Schätzungen zufolge 40-80% der Oropharynxkarzinome durch HPV verursacht, in Europa schwanken die Schätzungen zwischen 20-90% je nach Land und Studienpopulation [143, 232]. Diese HPV-positiven Oropharynxkarzinome unterscheiden sich auch klinisch-prognostisch. Die Patienten sind in der Regel jünger (40-55 Jahre) und zeigen eine geringere bis keine

Assoziation zu den klassischen Risikofaktoren Rauchen und Alkoholabusus [134]. Es wird von einem sexuellen Übertragungsweg ausgegangen [215].

Weitere Risikofaktoren sind z.B. eine Asbest-Exposition bei Larynxkarzinomen oder EBV-Infektionen, insbesondere bei Nasopharynxkarzinomen sowie eine schlechte Mundhygiene und Parodontose [232, 262]. Diese sind jedoch gegenüber den oben genannten Risikofaktoren deutlich nachrangig zu betrachten und werden hier nicht weiter erörtert.

1.2 Tumorentstehung

Lange betrachtete man Tumoren als eine homogene Masse aus Tumorzellen, die durch Mutation entstehen und sich ungebremst teilen. Durch eine gesteigerte genetische Instabilität und Hyperproliferation im späteren Verlauf der Tumorentwicklung bilden sich verschiedene Subpopulationen aus, so dass am Ende der Tumorentstehung eine inhomogene Tumormasse bestehen kann [97]. In dieser Theorie zeigen alle Zellen potenziell die Fähigkeit zur Tumorprogression durch verschiedene evolutionäre Prozesse, wie z.B. spontane Mutationen und den hieraus entstehenden Wachstums- bzw. Selektionsvorteilen eines Klons (Klonales Tumor-Evolutionsmodell nach Nowell) [149, 161].

Dem gegenüber steht das hierarchische Modell, die Tumorstammzelltheorie, die in den letzten Jahren zunehmend in den Blick der aktuellen Forschung geriet. Sie postuliert, dass die Inhomogenität vieler Tumore, mit Regionen unterschiedlicher Differenzierung, Vaskularisation, Inflammation und Invasivität, bereits auf zellulärer Ebene beginnt, also nicht am Ende der Tumorentwicklung, sondern an deren Anfang steht. Hierbei ist eine Unterklasse neoplastischer Zellen mit besonders ausgeprägter Tumorigenität und dem Potenzial zur Selbsterneuerung, die sogenannten Tumorstammzellen (*Cancer stem cells*, CSC) [97, 200] oder „*tumor initiating cells*“ (TIC) [152] von besonderem Interesse. In diesem Modell haben nicht alle Zellen dasselbe Potenzial zur Tumorprogression und Proliferation. Es wird von einer ersten Tumorzelle ausgegangen (Ursprungszelle), die sich durch innere und äußere Einflüsse, sogenannte *oncogenic hits* zu einer tumorigenen Zelle entwickelt und aus der sich, ähnlich wie normale Gewebe auf Basis von Stammzellen entstehen und sich erneuern, der Tumor ausbildet [200, 264]. Die für die CSC-Entwicklung typischen Eigenschaften sind die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und eine gewisse Langlebigkeit. Hierdurch wird die Zelle anfälliger für genetische und epigenetische Veränderungen, sodass es eher zu einer Transformation kommen kann [264]. Naheliegend ist hierbei die Annahme, dass die Vorläuferzellen einer solchen

Tumorstammzelle bereits zuvor Stammzeleigenschaften aufweisen und sich durch genetische Veränderungen zu Tumorzellen entwickeln, sich also aus normalen Stammzellen oder zumindest aus, den Stammzellen nachgeschalteten, Progenitorzellen heraus ausbilden. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass auch aus vormals differenzierten Zellen, welche durch genetische oder epigenetische Veränderungen die oben genannten entscheidenden Eigenschaften der Selbsterneuerung und Langlebigkeit zurückerlangt haben, Tumorstammzellen entstehen können [245]. Beide Theorien über den Ursprung der Tumorstammzellen: 1) Mutation normaler Stammzellen oder 2) De-Differenzierung von Tumorzellen, die stammzell-ähnliche Eigenschaften annehmen, haben ihre Berechtigung und erhalten je nach Lokalisation und Entität des Tumors unterschiedliche Bedeutung [9, 93]. Die Entstehung der CSC ist abschließend noch nicht verstanden. Entscheidend für die Definition und die Identifizierung von CSC ist jedoch nicht die Genese der Tumorstammzellen, sondern ihre Eigenschaften, wie z.B. Oligo- bzw. Pluripotenz [93], die Grundlage für Ausbildung, Progress und Rekurrenz der Tumoren sind. Bezüglich der Genese von CSC besteht noch Uneinigkeit, jedoch ist man sich über ihre Existenz einig. Lapidot et al., Bonnet und Dick sowie Reya und Mitarbeiter beschrieben erstmals die Existenz von CSC bei hämatologischen Malignomen [93, 97, 185]. Sie zeigten, dass eine kleine Subpopulation der Tumorzellen nach Transplantation in immundefiziente Mäuse, mit den Ursprungstumoren phänotypisch und pathologisch verwandte Tumoren in diesen heranwachsen lassen konnte [3, 124, 220]. Die Tumorzellsubpopulation wurde anhand von Durchflusszytometrie (FACS) aufgrund von Stammzelloberflächenmarkern isoliert [93, 124]. Erst später fand man sie auch in soliden Tumoren. Al-Hajj et al. beschrieben eine Subgruppe CD44-positiver Mammakarzinom Zellen, die nach serieller Implantation von nur 100 dieser Zellen in immundefiziente Mäuse in der Lage war neue Tumore auszubilden. Hierdurch unterschieden sich diese Zellen deutlich von anderen Zelltypen innerhalb des Tumors. Weiterhin waren diese Zellen in der Lage, nicht nur ihren eigenen, sondern auch weitere Phänotypen von Tumorzellen auszubilden, was ihre Pluripotenz bestätigte. Die Oberflächenmarker entsprachen hierbei Markern, die auch herkömmliche normale Gewebestammzellen aufweisen (CD44(+)/CD24(-/low)) [7]. Diese Beobachtungen konnten Prince et al. ebenfalls in einem immundefizienten-Mausmodell für HNSCC bestätigen. Sie zeigten, dass ein kleiner Teil von (CD44+)-HNSCC Tumor-Zellen (<10% der Tumorzellen) in der Lage war neue Tumoren in vivo auszubilden [173]. Auch andere Arbeitsgruppen zeigten, dass Tumorstammzellen die Fähigkeit besitzen,

Tumore in gesunden Geweben bzw. Organismen neu oder wieder entstehen zu lassen [47, 137]. CSC-Kandidaten wurden in immer mehr Malignomen, u.a. von Mamma, Eierstock, Kolon, Prostata, Pankreas, Gehirn [53, 58, 60, 101, 129, 163, 186, 205] und auch wiederholt in HNSCC gefunden [42, 138, 173, 252, 263].

Zu den typischen Oberflächenmarkern von Tumorstammzellen zählen neben CD44, CD133, CD34 unter anderem auch die sogenannten ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Effluxpumpen, wie z.B. ABCC2 und ABCG2 [7, 124, 152, 164, 224], welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Insgesamt erscheint es möglich, dass beide Modelle der Tumorentstehung, das klonale Modell wie auch die Tumorstammzelltheorie eine Rolle spielen bzw. sich ergänzen. So ist es wahrscheinlich, dass auch die CSCs selbst einer klonalen Selektion mit stochastischen Mutationen und epigenetischen Veränderungen unterworfen sind bzw. auf Basis dieser Mechanismen entstehen und dass beide Modelle nebeneinander existieren können [200, 245], wobei je nach Entität mal mehr das eine, mal mehr das andere Modell in unterschiedlicher Ausprägung an der Tumorausbildung beteiligt ist [152]. So legen die Untersuchungen von Quintana et al. nahe, dass Melanome nicht hierarchisch-organisierte Tumore sind. Unabhängig vom Krankheitsstadium zeigte sich der Großteil der Melanomzellen tumorigen, trotz eines Arrays mit 22 verschiedenen Markern konnte keine Sub-Population ohne dieses tumorigene Potenzial isoliert werden [179]. HNSCC hingegen scheinen in ihrer Tumorigenese dem CSC-Modell zu folgen [152, 212, 234]. Allerdings bedarf es einer weiteren Aufarbeitung der molekularen Mechanismen speziell in HNSCC, um präferentiell exprimierte Signalwege zu analysieren, um mögliche Therapieansätze zu finden. Zudem sollten die bisher an HNSCC-Zelllinien gemachten Beobachtungen an primären HNSCC-Patientenproben bestätigt werden [152]. Es verdichten sich die Hinweise, dass CSC die Chemotherapieresistenz und Tumorrekurrenz begünstigen und so maßgeblich die Prognose des Tumorpatienten beeinflussen [152, 212].

1.3 Chemotherapieresistenz, am Beispiel von Cisplatin und seinen Analoga

Cisplatin ist ein verbreitetes Zytostatikum, das insbesondere auch bei HNSCC zur induktiven Chemotherapie und primär simultanen Radiochemotherapie eingesetzt wird. Erstmals zugelassen wurde Cisplatin (cis-Diammindichoroplatin, CDDP) 1978 durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zur Behandlung von Hoden- und Blasenkrebs [78]. Die Wirksamkeit von CDDP wurde auch für andere solide Tumoren, u.a. ovariale und kolorektale Tumore sowie Lungen- und Kopf-Hals-Karzinome nachgewiesen [77, 126, 172].

Die Behandlung mit CDDP führt häufig zu einer partiellen Remission oder einer *stable disease*. Jedoch wiesen nicht wenige Patienten von Beginn an eine Resistenz auf oder entwickelten diese im Verlauf der Behandlung nach initial gutem Ansprechen [78, 120]. Die hohe Inzidenz einer Resistenzentwicklung limitiert den Nutzen im klinischen Alltag stark, insbesondere in Anbetracht der schwerwiegenden Nebenwirkungen von Cisplatin mit insbesondere Nephro- und Neurotoxizität sowie Ototoxizität [115]. Seit den frühen 1980er Jahren stehen Platinderivate mit etwas geringerem Nebenwirkungsprofil zur Verfügung. Carboplatin, welches sich insbesondere durch eine reduzierte Oto- und Nephrotoxizität auszeichnet, wurde 1989 erstmals zur Therapie von Ovarialkrebs von der FDA zugelassen. Allerdings haben Carboplatin und Cisplatin die gleiche aktive Form: Sie bilden dieselben DNA-Addukte, Carboplatin allerdings mit einer niedrigeren Potenz. Daher ist es nicht überraschend, dass Tumoren mit Cisplatin-Resistenz auch eine Kreuzresistenz gegenüber Carboplatin aufweisen [78]. Oxaliplatin, das eine Wirksamkeit bei cis- und carboplatinresistenten Tumoren zeigte, wurde um 2000 eingeführt (Zulassung in Europa und Deutschland 1999 und 2002 in den USA) [157, 240] und ist in Therapieregimen bei der Behandlung von kolorektalen Karzinomen etabliert [78]. Allerdings wiesen Studien auch für Oxaliplatin auf Kreuz-Resistenzen hin [217]. Trotz einer intensiven Suche nach alternativen Chemotherapeutika bleibt insbesondere in bestimmten klinischen Situationen Cisplatin als eine der letzten, wenn nicht gar als einzige Therapieoption bestehen [18]. Auch modernere Platinanaloga zeigten bislang keinen signifikanten zusätzlichen Benefit [48, 68].

Schlussendlich bleibt die häufige Ausbildung von Resistenzen und Kreuzresistenzen mit Carboplatin und anderen Platinanaloga der größte limitierende Faktor für den klinischen Nutzen von Cisplatin und seinen Analoga [78, 95]. Daher ist es sinnvoll mehr über die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen von Cisplatin und seinen Derivaten zu erfahren, mit dem Ziel diese besser zu verstehen, um so Resistenzmechanismen überwinden zu können oder den Patienten eine nebenwirkungsreiche Therapie, von welcher sie ggf. nicht profitieren (*CDDP-Non-Responder*), ersparen zu können.

Ursachen für die Resistenzentwicklung im Allgemeinen und insbesondere gegen CDDP sind einerseits eine gesteigerte Detoxifikation durch Thiole, eine Aktivierung von Reparaturmechanismen und die verminderte zelluläre Akkumulation [95]. Letztere kann durch eine verminderte Aufnahme (CTR1, passive Diffusion) oder einen verstärkten Ausstrom bedingt sein. Dieser vermehrte Ausstrom wird im Wesentlichen

durch ABC-Transporter vermittelt, welche daher teilweise auch als *Multi Drug Resistance Proteine* bezeichnet werden [95].

1.4 ABC-Transporter und ihre Rolle bei der Chemotherapieresistenz

Bei den ABC-Transportern handelt es sich um eine Familie von 49 *ATP-Binding Cassette* Transmembranproteinen, die in 7 Unterfamilien ABC A-G auf Basis homologer Sequenzen und Strukturen eingeteilt werden [74, 107, 231, 243]. Ihre Gemeinsamkeit liegt in ihren *ATP-Binding Cassettes*, die auch Namengebend sind. Sie weisen üblicherweise 2 hydrophobe Transmembrandomänen auf, sowie 2 Nukleotid (ATP)-Bindungsdomänen und bilden Dimere aus. Sie sind stark in Medikamentenresistenzen, Mukoviszidose und eine Reihe weiterer Erkrankungen, wie das Dubin-Johnson Syndrom involviert [50, 144]. Ihre physiologische Aufgabe ist der energieabhängige (ATP-Hydrolyse) [243, 253] Transport von zahlreichen negativgeladenen Substraten entgegen eines Konzentrationsgradienten über extra- und intrazelluläre Membranen, darunter Stoffwechselprodukte, organische Anionen, Botenstoffe, Medikamente und Steroide [74, 188, 231]. Sie dienen so u.a. der Entgiftung der Zelle. Auf diesem Weg wird auch Cisplatin als Chelatkomplex mit Metallothioneinen sowie mittels Glutathion über die Membran aus der Zelle heraustransportiert. Dies hat eine reduzierte Akkumulation von Cisplatin in Tumorzellen zur Folge, was die Effizienz der Therapie limitiert [74, 104, 145, 247]. ABC-Transporter und insbesondere ABCC2 und ABCG2 werden mit einer schlechten Prognose nach CDDP-Therapie assoziiert [74].

Allerdings wurde von einigen Arbeitsgruppen bereits gezeigt, dass nicht allein das Vorhandensein von Effluxtransportern für die Resistenz verantwortlich ist [52]. Es spielt z.B. auch ein erhöhtes Level von Glutathion eine Rolle. Senkt man die Glutathionkonzentration, z.B. mit Buthioninsulfoximin steigt die Sensitivität für zytotoxische Therapien [96], was durch einen verminderten Ausstrom zytotoxischer Stoffe bedingt ist. Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist in viele weitere elementare zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, posttranslationale Modifikationen von Proteinen, Immunantworten und Apoptose involviert [30]. Zudem wird postuliert, dass Leukotriene und Prostaglandine zu den Substraten der ABC-Transporter zählen, was Hinweis auf eine noch größere Bedeutung der ABC-Transporter in der Tumorbio-logie sein könnte [74]. So transportiert u.a. ABCC2 mit der Tumorgenese assoziierte Prostaglandine, wie z.B. PGF₂ nach extrazellulär [74], wo sie eine wachstumsfördernde Inflammation [142], Tumorprogression, einschließlich Zellmobilität und Zellproliferation [246], Angiogenese [238] und Metastasierung [92]

stimulieren und durch Hemmung der Differenzierung von antigenpräsentierenden (z.B. dendritischen) Zellen einen Schutz vor der *Immunsurveillance* des körpereigenen Immunsystems bieten [211].

Therapien, die auf eine Hemmung der ABC-Transporter abzielten u.a. mit Verapamil und Cyclosporin A, als ABC-Inhibitoren der ersten Generation mit Wirkung auf ABCB1, oder Valspodar (2. Gen.) und Zosuquidar (3. Gen.) erbrachten wenig zusätzlichen Benefit bei vermehrten Nebenwirkungen [74]. Allerdings gibt es Hinweise, dass der Ausfall eines ABC-Transporters durch Überregulation eines anderen ausgeglichen werden kann [50], was möglicherweise den fehlenden therapeutischen Erfolg nach Hemmung einzelner ABC-Transporter erklären kann.

Es bedarf daher weiterer Untersuchungen der Rolle dieser vielseitigen Transmembranproteine und ihrer Rolle in der Kanzerogenese. Insbesondere bei HNSCC gibt es aktuell wenige Untersuchungen zu ABC-Transportern. Aufgrund ihrer starken Assoziation mit Chemotherapieresistenzen und (Tumor-) Stammzelleigenschaften ist eine weitere Untersuchung äußerst interessant.

In eigenen, publizierten Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe fanden wir eine Genüberexpression von ABCC2 und ABCG2 in CDDP-resistenten HNSCC [234] (siehe auch Kapitel 1.6).

ABCC2 (MRP2, *multidrug resistance-related Protein* oder cMOAT, *canalicular multispecific Anionentransporter*) und ABCG2 (MXR, *Mitoxanthrone-Resistance Gene* oder BCRP, *Breast Cancer Resistance Protein*) sind bedeutende Vertreter dieser Transporter, die im Folgenden näher betrachtet werden sollen. Ihre Bedeutung in der Chemotherapieresistenz ist ebenso belegt wie ihre bedeutende physiologische Rolle [50, 74, 144, 224, 247]. Sie dienen unter anderem der Entgiftung der Zelle und sind daher insbesondere in entgiftenden Organen wie z.B. der Leber, aber auch in Stammzellen hoch exprimiert. Die ABC-Transporter vermittelte Resistenz von Geweben ist daher gewebsspezifisch [95].

ABCC2 ist ein ATP-abhängiges Transmembranprotein, das zur ABC-Multigenfamilie gehört und ein Molekulargewicht von etwa 200 kDa aufweist [227]. Die Sequenz von ABCC2 ist zu 49% identisch mit der Sequenz von ABCC1 [95].

ABCC2 weist ergänzend zur üblichen ABCC-Transporter Struktur, bestehend aus 2 Transmembrandomänen (MSD1 und MSD2, von engl. *Membrane-Spanning-Domain*) aus üblicherweise 6 Alpha-Transmembran-Helices und den zwei intrazellulär gelegenen *ATP-Binding-Cassettes* (ATP-Bindungsdomänen) [107], eine zusätzliche Transmembrandomäne mit nur 5 gering konservierten Transmembran-Alpha-Helices

N-terminal auf, die sogenannte MSD0 [43]. Diese Struktur hat ABCC2 mit ABCC1, -3, -6 und -10 gemeinsam, den sogenannten langen MRPs. ABCC2 wird in normalen Geweben insbesondere in der apikalen Membran von Hepatozyten exprimiert, wo es die Ausscheidung anionischer organischer Salze über die Gallenwege ermöglicht [50, 107, 224, 253]. ABCC2 wird zudem in Epithelzellen der Gallenblase, des Dünndarms, des Colons, der Lunge, des Hodens und des Gehirns [50, 107, 224] sowie in den apikalen Membranen des proximalen Tubulus der Niere und der Synzytiotrophoblasten exprimiert und ist ein wichtiger Bestandteil der Blut-Plazenta-, Blut-Hoden- und der Blut-Hirn-Schranke [107, 224]. Da ABCC2 eine Medikamentenresistenz vermitteln kann, wurden mehrere Substanzen auf ihre modulierende bzw. hemmende Wirkung auf ABCC2 hin untersucht. Unter anderem zeigten sich der Leukotrien-Rezeptor Antagonist MK-571 [44] und andere für verschiedene Krankheiten eingesetzte Wirkstoffe, wie das Asthmatherapeutikum Montelukast, das in der Rheumatherapie eingesetzte nichtsteroidale Antirheumatikum (NSAR) Indometacin, das Immunsuppressivum Cyclosporin A, der als Antidiabetikum eingesetzte Sulfonylharnstoff Glibenclamid, sowie Antibiotika wie Rifampicin und Azithromycin auf die ABCC2 Aktivität als wirksam [43].

ABCG2 besitzt anstatt von zwei nur jeweils eine Nukleotid-Binde Domäne (NBD), als Kernsegment und eine Membran-spannende Domäne (MSD) [159, 249], weshalb der Transporter auch als Halbtransporter bezeichnet wird [249]. Die genaue funktionale Struktur von ABCG2 *in vivo* bleibt unklar, vermutet wird eine Dimerbildung als Homodimer oder Homooligomer [30]. ABCG2 zeigt ein ähnliches Expressionsprofil wie ABCC2 in normalen Geweben. Es wird ebenfalls stark in der Leber, in den apikalen Membranen des Gastrointestinaltraktes und in den plazentaren Synzytiotrophoblasten sowie den Blutgefäßkapillaren des Gehirns exprimiert, darüber hinaus ist eine starke Expression in normalen Stammzellen beschrieben [110, 159, 249]. Auch ABCG2 wird eine Rolle in den Funktionen der Blut-Hirn-Schranke, der Blut-Hoden-Schranke, der Blut-Plazenta-Schranke sowie in der oralen Wirkstoffabsorption und für den Schutz vor Xenobiotika zugesprochen ([188]. Tariquidar ist als spezifischer ABCG2- und ABCB1 (MDR1)-Inhibitor mit hoher Affinität zu beiden Transportern anerkannt [188-189].

Sowohl ABCC2 als auch ABCG2 spielen in der Zell-Homöostase eine bedeutende Rolle. Sie können Glutathion und dessen oxidierte Form, Glutathiondisulfid (GSSG) aus der Zelle transportieren und dienen so der Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts [41]. Folglich korrelieren ein erhöhtes Potenzial für den GSH- bzw. Glutathiondisulfid (GSSG)-Export und die vermehrte ABCG2- und ABCC2-

Expression [30, 41] miteinander. ABCC2 besitzt eine höhere Affinität für GSSG und kann auf diese Weise gebundene reaktive Sauerstoffspezies („freie Radikale“) aus der Zelle schleusen [41] und so die Zelle vor Apoptose schützen. Zusätzlich scheinen ABCC2 und ABCG2 insbesondere in der Proliferationsphase eine Rolle zu spielen. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass insbesondere Zellen in der Proliferationsphase eine vermehrte Expression von ABCC2 und ABCG2 zeigen [234].

In Stammzellen gewährleisten die erhöhten Expressionslevel der ABC-Transporter, einschließlich ABCC2 und ABCG2 [61, 64], den Erhalt des Gewebes, in dem sie die Stammzellen entgiften und vor Apoptose schützen [224].

Surowiak et al. machten interessante Beobachtungen zur nukleozytoplasmatischen Lokalisation von ABCC2 und Chemotherapieresistenz in Ovarialkarzinomen. ABCC2 war in niedrig differenzierten Zellen bzw. sich stärker teilenden Zellen, v.a. in der nukleären Membran lokalisiert. Auch in den Zellen der Basalschicht fand sich ABCC2 insbesondere in nukleärer Lokalisation, wobei differenzierte Keratinozyten in der granulären Schicht eher eine zytoplasmatische ABCC2 Anreicherung zeigten. Die Lokalisation von ABCC2 in der Kernmembran war mit einer besseren Detoxifikation bzw. einem besseren Apoptoseschutz assoziiert [224]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Cisplatin die nukleäre Lokalisation von ABCC2 induzieren kann. Diese Umverteilung von ABCC2 nach nukleär aufgrund einer Chemotherapie-Exposition korrelierte mit einer höheren Resistenz gegen Cisplatin und ist Ausdruck des Selbstschutzes der Zelle vor Toxinen. Exposition von Zellen mit einem Toxin führt regelmäßig zu einer vermehrten ABC-Transporter-Expression [224]. Insgesamt korrelierte eine vermehrte nukleäre Lokalisation von ABCC2 mit einer schlechteren Prognose und vermehrten CDDP-Resistenz in Ovarialkarzinomen. Rezidivtumore zeigten ebenfalls eine gesteigerte nukleäre ABCC2-Expression [224].

1.5 Tumorstammzellen und ihre Bedeutung für die Chemotherapieresistenz

Tumorstammzellen exprimieren typische Stammzellmarker [7, 152, 164, 224]. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können sich durch asymmetrische Zellteilung in verschiedene Zelltypen differenzieren. Sie können Tumorwachstum auslösen und durch verschiedene Mechanismen aufrechterhalten, außerdem werden sie mit der Ausbildung von Metastasen und Tumorrezidiven nach scheinbar erfolgreicher Therapie in Verbindung gebracht [3, 14, 64, 89, 136, 173, 202, 212, 220, 245]. Aufgrund dieser Eigenschaften stellen diese Tumor-initiiierenden Zellen, als

kleine Gruppe hoch-tumorigener Zellen ein neues und sinnvolles Ziel in der Antitumortherapie dar [173]. Aktuell werden diese von zytotoxischen Standardtherapien oft nicht erfasst, sondern ähnlich den gesunden Stammzellen im Körper verschont [64]. In der Literatur wird beschrieben, dass CSC vermehrt Resistenzen gegen zytotoxische Standardtherapien, einschließlich Chemotherapeutika und ionisierende Strahlen aufweisen [3, 14, 61, 152, 173, 212, 245]. Die aktuellen Chemotherapeutika führen, vergleichbar mit der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen durch Selektionsdruck zu einer Anreicherung der CSC, indem die differenzierteren-sensibleren Tumorzellen zerstört werden, die resistenteren CSC aber überleben. So kann auf Basis dieser CSC der Tumor nach der chemotherapeutischen Behandlung erneut entstehen und unter Umständen eine Resistenz gegen ein oder mehrere Chemotherapeutika entwickelt haben [173, 212]. Es wird angenommen, dass die CSC einem langsameren Zellzyklus unterliegen und eine deutliche Überexpression von Efflux Transportern, wie ABCC2 und ABCG2 aufweisen, die sie vor toxischen Substanzen durch vermehrten Efflux schützen [61, 64, 152].

Die erhöhte Effluxtransporter-Expression in Stammzellen wird dazu genutzt CSC-Populationen aus Tumoren durchflusszytometrisch darzustellen, da sie häufig die Fähigkeit besitzen den Farbstoff Hoechst 33342 vermehrt aus der Zelle auszuschleusen [251], welche sich im FACS als sogenannte *Side Population* (SP)-Zellen darstellen. Möchte man diese CSC therapeutisch angreifen, setzt dies voraus, dass die normalen Stammzellen des Organismus ausreichend geschont werden können [245]. Um sinnvolle Ansatzpunkte einer spezifischen Zerstörung dieser Tumor-initiiierenden Zellen mittels Therapeutika evaluieren zu können, bedarf es dringlich weiterer Untersuchungen. Bisher gibt es keine Methodik, die zuverlässig reine CSC-Populationen isolieren kann, weshalb weitere Untersuchungen zu Oberflächenmarkern erforderlich sind [152].

Die Mortalität von HNSCC-Patienten wird häufig durch die frühe Metastasierung bestimmt, von regionalen Lymphknotenmetastasen bis hin zur selteneren hämatogenen Fernmetastasierung, welche erst in fortgeschrittenen Stadien zu beobachten ist [136, 215]. CSC werden hierbei als wichtige Lieferanten von Tumorzellen für die Metastasierung gesehen [136], so wurde in stark-metastasierenden HNSCC-Tumorzelllinien eine 20fach erhöhte Anzahl an *Side Population* (SP)-Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften und vermehrter Chemoresistenz sowie gesteigerter Invasivität nachgewiesen [212]. Die HNSCC-SP-

Zellen zeigten eine vermehrte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, welcher in diversen Aspekten der normalen Stammzellbiologie, wie der Selbsterneuerung, einschließlich dem Erhalt der Pluripotenz, Differenzierung und Proliferation eine Rolle spielt [46, 197, 212, 226, 257]. Auch in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Chemotherapieresistenz und das Vorliegen eines ausgeprägten SP-Phänotyps in HNSCC in signifikantem Maß korrelieren. In der Untersuchung von 9 p53-mutierten (p53^{mut}) HNSCC-Zelllinien wiesen Zellen mit einer Mutation des *Nuclear-Localisation-Signals* (NLS) und zytoplasmatischer Sequestration von p53 eine höhere Cisplatinresistenz auf [141]. Im weiteren Vergleich einer repräsentativen NLS-mutierten, CDDP-resistenten HNSCC-Zelllinie (UT-SCC-26A) und einer CDDP-sensitiven Tumor-Zelllinie mit Nachweis von nukleärem p53 (UM-SCC-3) wies die CDDP-resistente Zelllinie nicht nur eine größere *Side Population* (SP) auf und zeigte damit einen stammzell-ähnlichen Phänotyp [234], sondern exprimierte hierzu passend vermehrt ABCC2- und ABCG2-Effluxpumpen. ABCG2 zeigte sich in der weitergehenden Analyse als für die Ausbildung der Hoechst 33342-SP hauptverantwortlich [234].

Insgesamt fand man CSC sowohl in primären Tumoren als auch in Metastasen [26, 212]. Offen bleibt die Frage, ob es zwei *Pools* von CSC gibt. Erstens „Wandernde“, die als Grundlage für eine Metastasierung dienen und zweitens „Stationäre“, die den Primarius initiieren und dessen Erhalt sowie Lokalrezidive bedingen. Sollte dies der Fall sein, wäre es erforderlich beide Subtypen der CSC unter Berücksichtigung möglicher Unterschiede zu behandeln, um Rezidive oder eine Metastasierung zu verhindern [26].

CSC stellen daher aufgrund ihrer Eigenschaften ein alternatives Ziel für eine Antitumorthherapie dar.

1.6 Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe und Motivation

In Voruntersuchungen der eigenen Studiengruppe konnte gezeigt werden, dass die nukleozytoplasmatische Lokalisation des Tumorsuppressorproteins p53 für die Cisplatinresistenz in HNSCC von Bedeutung ist. Zellen mit Nachweis einer Mutation, welche das C-terminale nukleäre Lokalisationssignal (NLS) von p53 beeinträchtigen, wiesen eine höhere Cisplatinresistenz auf [141]. Diese resistenten Zellen exprimierten aufgrund des NLS-Verlusts p53 überwiegend zytoplasmatisch [141].

Um die Resistenzmechanismen der Cisplatin-resistenten Zelllinien weiter aufzuschlüsseln, wurde eine Microarray-Analyse zur Identifikation möglicher Kandidaten-Gene durchgeführt. Insbesondere 2 ABC-Transporter zeigten sich in den

resistenten Zelllinien gegenüber den sensitiven Zelllinien hochreguliert: ABCG2 (BCRP-1) und ABCC2 (MRP2) [234]. In den weiteren Untersuchungen konnte an zwei repräsentativen Zelllinien das Ergebnis der Microarray-Analyse verifiziert werden. Die HNSCC-Zelllinie UT-SCC-26A zeigte, als CDDP-resistente Zelllinie, mit zytoplasmatischer Anreicherung von mutiertem p53 (p53^{mut}) gegenüber UM-SCC-3, als CDDP-sensitive Zelllinie mit nukleär angereichertem p53^{mut} sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine stärkere Expression der ABC-Transporter ABCC2 und ABCG2 [234]. Beide Transporter werden mit Chemotherapieresistenzen [23, 74, 144] und einem Tumorstammzell-Phänotyp [7, 61, 64, 152, 224] assoziiert und besitzen unter anderem die Fähigkeit, durch einen erhöhten Efflux von Chemotherapeutika eine MDR der Tumorzelle zu vermitteln [45, 90, 188, 202, 220]. Zellen mit einem Stammzellphänotyp werden u.a. über Ihre Fähigkeit Hoechst 33342 aus der Zelle zu transportieren definiert [88]. Entsprechend der Tumorstammzelltheorie können Tumorstammzellen aufgrund ihrer hohen Expression von z.B. ABC-Transporter-Effluxpumpen im Gegensatz zu den übrigen Tumorzellen Chemotherapien besser überleben [104]. Sie sind so maßgeblich für das Auftreten von Therapieresistenzen, Rezidiven sowie Metastasen bei Tumorerkrankungen verantwortlich, wodurch die Prognose der Tumorpatienten entscheidend negativ beeinflusst werden kann [5-6, 173]. In den zwei von uns untersuchten Tumorzelllinien wies passend hierzu die resistente HNSCC-Zelllinie, UT-SCC-26A eine ausgeprägte SP auf und repräsentierte gemeinsam mit der erhöhten Expression der ABCC2- und ABCG2-Effluxpumpen einen stammzell-ähnlichen Phänotyp [234]. Die Erkenntnisse passen zur aktuellen wissenschaftlichen Lage, nach welcher ABC-Transporter in normalen Stammzellen und Tumorstammzellen vermehrt exprimiert werden, wo sie zu einer vermehrten Entgiftung und folglich zu einem verbesserten Zellüberleben beitragen [61, 64, 152]. Unsere Daten legen nahe, dass HNSCC einem CSC-Modell in der Tumorgenese folgen [234], wie auch schon zuvor von anderen Arbeitsgruppen postuliert [152, 212]. Eine weitere Beobachtung unserer Arbeitsgruppe war, dass in der CDDP-sensitiven Tumorzelllinie UM-SCC-3 nur die wenigen in Mitose befindlichen Zellen eine vermehrte Expression der ABC-Transporter aufwiesen [234]. Solche Ergebnisse, die auf eine Bedeutung der ABC-Transporter für die bzw. während der Zellteilung hinweisen, werden auch von Beobachtungen anderer Forschungsgruppen gestützt [213].

Eine Hemmung der verantwortlichen ABC-Transporter könnte möglicherweise dazu beitragen, eine Chemotherapieresistenz zu überwinden oder dazu dienen, CSC gezielt zu bekämpfen [14, 89, 245].

Die Ergebnisse der Vorarbeiten motivierten uns die Expression von ABCC2 und ABCG2 an einer größeren Anzahl von HNSCC-Patientenproben zu untersuchen und sowohl mit klinischen Daten als auch weiteren Tumormarkern zu korrelieren, um sowohl die beobachteten Ergebnisse an einer größeren Anzahl an HNSCC zu überprüfen als auch die mögliche klinische Bedeutung dieser Transporter und begleitend eines möglichen Stammzellphänotyps besser abschätzen zu können. Die folgende Arbeit ist eine immunhistochemische Studie an 98 HNSCC-Patienten. Es wurde die Expression von ABCC2, ABCG2 und p53 betrachtet und die Ergebnisse mit klinischen Daten korreliert. Begleitend wurden Ki-67 als Proliferationsmarker und CK19 als weiterer Marker undifferenzierter Zellen bzw. von Stammzellen untersucht. Unter anderem sollte hierbei evaluiert werden, ob analog zu den Ergebnissen an den HNSCC-Zelllinien resistente HNSCC-Tumore bzw. prognostisch-ungünstigere HNSCC-Tumore eine erhöhte Expression von Stammzellmarkern, wie ABCG2 und ABCC2 aufweisen.

In der aktuellen Literatur gibt es nur wenige Untersuchungen zu ABCC2 und ABCG2 bei HNSCC-Tumoren, insbesondere zu ABCC2 und Cisplatinresistenz bei Kopf-Hals-Karzinomen liegen nur wenige Untersuchungen vor [229, 241], was uns in der Bearbeitung dieses Themas weiter bestärkte.

2 MATERIAL

2.1 Patientengewebe

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gewebeproben stammen aus regulären operativen Eingriffen, welche im Zeitraum vom 18.09.2007 bis 21.11.2011 an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde in Marburg durchgeführt wurden. Zu den genannten Präparaten liegen ein positives Votum der Ethikkommission des FB Medizin der Philipps-Universität Marburg vom 18.09.2007 (Titel: *„Zell- und Molekularbiologische Untersuchungen von Geweben, Biomolekülen und Kandidatengen bei Erkrankungen des Kopf-Halsbereiches“*; AZ 149/07) sowie ein auf das gleiche Ethikvotum bezogenes Addendum vom 22.11.2011 vor. Bei allen Untersuchungen wurden die Gewebe entsprechend den Vorgaben der Ethikkommission und der schriftlichen Einwilligung der Patienten eingesetzt. Hierbei handelte es sich um überschüssiges Gewebe, welches nicht vom Institut für Pathologie zur Diagnosefindung, Beurteilung von Resektionsrändern etc. benötigt wurde. In keinem Falle wurden Versuche direkt am Patienten durchgeführt. Eine detaillierte, anonymisierte Liste der verwendeten Proben ist im Anhang zu finden (Tab. 10).

2.1.1 Kontrollgewebe

Die Kontrollproben stammen aus dem oben genannten Sammelzeitraum, aber überwiegend auch aus 2004. Gewebeproben, die vor 2005 gewonnen wurden, können entsprechend einer Entscheidung der Ethikkommission bei durch die Ethikkommission (EKK) positiv beschiedenen Projekten mit eingesetzt werden.

2.2 Technische Ausrüstung und Geräte

Analysenwaage Discovery	OHAUS Waagen Vertriebs GmbH, Gießen, Deutschland
Autoklav Autoclavi Spa	Fedegari GmbH, München, Deutschland
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank MF	Porkka Deutschland GmbH, Tornesch, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Glaspipette 1 ml	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Glaspipette 25 ml	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Heidolph Reax 2000 - Schüttelmaschine	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Heizblock HCL HBT 130	Otto E.Kobe KG, Marburg, Deutschland
Kühlschrank MC	Porkka Deutschland GmbH, Tornesch, Deutschland

Leica TCS SP2	Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland und Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg Deutschland
Lichtmikroskop Axio Imager 2	Carl Zeiss AG, Deutschland
Lichtmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz
Labor-pH-Meter Typ 646	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Pipette (0,1-2 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipette (1-10 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipette (2-20 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipette (20-100 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipette (50-200 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipette (200-1000 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipettierhelfer Pipetus®	Otto E.Kobe KG, Marburg, Deutschland
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Reinstwasseranlage Astacus	membraPure GmbH, Berlin, Deutschland
Sicherheitswerkbank	DJB Labcare, Newport Pagnell, England
Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Wasserbad	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland

2.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Entsorgungsbeutel	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Fettstift (Super PAP Pen)	Immunotech, Beckman Coulter Inc., Marseille, France
Latex Handschuhe	Nobaglove, Wetter, Deutschland
Nitril Handschuhe	Nobaglove, Wetter, Deutschland
Objektträger Eprexia™ SuperFrost Plus™	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipettenspitzen (200 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipettenspitzen (1000 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Terralin liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland

2.4 Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Strept(Avidin)-Biotin-Complex	Dako North America, Inc, Carpinteria, USA

Corbitbalsam	Hecht, Kiel-Hassee, Deutschland
(Liquid) DAB+ Chromogen	Dako North America, Inc, Carpinteria, USA
Dako Antibody Diluent (S3022)	Dako North America, Inc, Carpinteria, USA
Ethanol	Schmidt Chemikalien, Dillenburg, Deutschland und Mallinckrodt Baker Deutschland, Griesheim, D
Goat Serum (G9023)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Hämalaun (Hämatoxylin)	Fluka™, Honeywell, Seelze, Deutschland
HCl (Chlorwasserstoffsäure)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Normal Mouse IgG	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS= Phosphate Buffered Saline)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pufferlösung pH 4,0	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pufferlösung pH 7,0	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>ROTI®Histol</i>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trinatriumcitratdihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Base	Acros Organics, New Jersey, USA
Tris-HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.5 Primäre Antikörper

Anti-ABCC2 (M2I-4, sc-59609, Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA
Anti-ABCG2 (sc-58222, Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA
Cytokeratin 19 (sc-6278, Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA
p53 (sc-126, Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA
Ki-67 (Clone: MIB-1, M 7240, Maus)	Dako North America, Inc, Carpinteria, USA

2.6 Sekundäre Antikörper

Anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat (A 2554, Ziege)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
--	-------------------------------------

2.7 Puffer und Lösungen

10 mmol/l tri-Na-Citrat-Dihydrat-Puffer (pH 6,0):

Trinatriumcitrat-dihydrat	2,941 g
HCl	ca. 6-8 ml, pH titrieren
a. d.	1,0 l

PBS-Waschpuffer für Immunhistologie 0,15 mol/l (pH 7,4):

PBS	1,431 g
a. d.	1,0 l

10x Stammlösung für TBS, Spülpuffer (pH 7,4):

NaCl	53 g
Tris-Base	12 g
a. d.	1,0 l

TBS, Spülpuffer (pH 7,4):

NaCl	5,3 g
Tris-Base	1,2 g
a. d.	1,0 l

3 METHODEN

Um die Expression der beiden Transporter an einer größeren Patientenzahl untersuchen zu können und die Korrelation mit klinischen Parametern zu ermöglichen wurden immunhistochemische Färbungen auf ABCC2 und ABCG2 in Gewebeproben von 98 HNSCC-Patienten durchgeführt. Zusätzlich wurde das Tumorsuppressor-Protein p53 betrachtet. Weiterhin wurden Ki-67 als Proliferationsmarker und CK19 als Marker undifferenzierter Zellen bzw. von Stammzellen [242] in den Geweben untersucht. Das Vorgehen zur Bestimmung des Kollektivs und die Ein- und Ausschluss-Kriterien sind den Kapiteln 3.1 und 3.2 sowie dem Flussdiagramm in Kapitel 3.3 (Abb. 1) zu entnehmen. Es verblieben 107 auswertbare Präparate von 98 Patienten. Die Präparate wurden mittels der ABC-Methode mit verschiedenen Primärantikörpern auf die Expression von p53, ABCC2, ABCG2, Ki-67 und CK19 untersucht und mit den klinischen Daten korreliert.

3.1 Definition des Patientenkollektivs

Mit Unterstützung durch den EDV-Beauftragten der Pathologie (Herr Baldeweg) wurde eine Recherche im KIS ORBIS des entsprechenden Sammelzeitraums des Ethikantrages (18.09.2007-21.11.2011) nach Pathologie-Aufträgen mit einer bestimmten Diagnose durchgeführt.

Die verwendeten Suchbegriff-Kombinationen waren:

- Lokalisation: LAR (Larynx), Veränderung: maligne Tumoren, KT-Diagnose: Plattenepithel. Zeitraum: 18.09.2007-21.11.2011
- Lokalisation: MUH (Mundhöhle), Veränderung: maligne Tumoren, KT-Diagnose: Plattenepithel. Zeitraum: 18.09.2007-21.11.2011
- Lokalisation: PHA (Pharynx), Veränderung: maligne Tumoren, KT-Diagnose: Plattenepithel. Zeitraum: 18.09.2007-21.11.2011

Anschließend wurde überprüft, ob eine Einverständniserklärung zur Verwendung der Proben entsprechend dem oben genannten Ethikvotum vorlag (siehe Kapitel 2.1).

Es ergab sich eine Liste mit 244 Proben. Die Liste mit diesen Dateien wurde erneut geprüft: Mehrfachnennungen desselben Präparats (Path-Nummer) und Proben, die keinen malignen Tumor enthielten, wurden ausgeschlossen. Lagen in einem Fall mehrere Proben, insbesondere vom selben Zeitpunkt (z.B. Primarius, Zeitpunkt Erstdiagnose) vor und schied eine der Proben nicht ohnehin aus, z.B. bei positiver Kontrollfärbung (Negativ-Reagenz-Kontrolle), so wurde durch Randomisierung mittels

Excel-Zufallszahl ein Präparat ausgelost und nur dieses in die Auswertung eingeschlossen. So ergaben sich zuletzt 98 Präparate für 98 Fälle. In 9 Fällen lagen sowohl ein Rezidiv als auch eine Primarius-Probe vor (9 Rezidiv-Primarius-Paare, Tabelle 13 im Anhang) auch in diesen Fällen wurde durch Losen je ein Präparat eingeschlossen.

3.2 Retrospektive Klinikdaten-Recherche

Zu den definierten Proben wurden anschließend klinische Falldaten zusammengetragen: *Grading*, (p)TNM, Datum der Erstdiagnose, Raucherstatus, HPV-Status, Alkoholanamnese, ob es sich bei der Probe um ein Rezidiv handelte, ob die Probe vor Entnahme chemotherapiert oder bestrahlt worden war, Patientenalter zum Zeitpunkt der Probenentnahme in Jahren, sowie ggf. weitere hilfreiche Informationen wurden in einer Tabelle in Microsoft Excel festgehalten. Als Basis der Recherche dienten pathologische Berichte und die hinterlegten Arztbriefe. Die Patientendaten wurden anschließend anonymisiert. Um später eine Zuordnung von Proben zu einem gleichen Fall zu ermöglichen, z.B. von Primarius und Rezidiv, wurden die Patientennamen durch eine fortlaufende Fallnummer beginnend mit 1 ersetzt, zusätzlich erfolgte eine numerische Zuordnung in Abhängigkeit der Lokalisation (Oropharynx 1, Larynx 1, usw.). Die Ergebnisse dieser Recherche sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Eine detaillierte Übersicht ist Tabelle 10 im Anhang zu entnehmen. Im Folgenden wird beschrieben, wie die Datenrecherche im Detail erfolgte.

3.2.1 Lokalisation

Der Entnahmeort der Probe wurde so präzise wie möglich angegeben. Um eine Auswertung und Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden die genannten Lokalisationen den zugehörigen anatomischen Überregionen (Mundhöhle, Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx) zugeordnet. In einzelnen Fällen, bei welchen eine solche Zuordnung nicht eindeutig möglich war, erfolgte die Zuordnung anhand der in der Diagnose genannten regionalen Bezeichnung. Für einzelne Proben konnte keine eindeutige Zuordnung erfolgen. Lagen mehrere Proben mit eindeutiger Zuordnung in einem Fall und demselben Tumor vor, wurde die häufiger genannte Lokalisation verwendet und somit die Datenlücke geschlossen. War auch dies nicht eindeutig möglich (7 Fälle), wurde wiederum die im Arztbrief genannte regionale Bezeichnung verwendet, sofern hier eine eindeutige Festlegung erfolgt war. Wurde keines dieser Kriterien erfüllt, führte dies zum Ausschluss der Probe.

3.2.2 Differenzierungsgrad bzw. Grading

Im Regelfall wurde der Differenzierungsgrad der jeweiligen Probe angegeben. Lagen mehrere Proben in einem Fall vor oder wurde das *Grading* als Intervall (z.B. 2-3) angegeben, wurde die niedrigere Graduierung verwendet. Bei Rezidiven wurde das *Grading* des initialen Tumors verwendet, was auch der gängigen klinischen Praxis entspricht. Ebenso wurde bei bestrahlten oder chemotherapierten Tumoren verfahren: In diesen Fällen wurde das *Grading* der initialen Probeexzision verwendet, auch dies entspricht der gängigen Praxis, da sich durch die Behandlung eine Gewebedestruktion ergibt, die zu einer Fehlinterpretation führt.

3.2.3 TNM

Im Regelfall wurde die pTNM, die pathologische TNM des zugehörigen Hauptresektats aus dem jeweiligen pathologischen Abschlussbefund verwendet. In einzelnen Fällen, in denen auch nach gründlicher Recherche keine sichere pTNM zuzuordnen war, z.B. wenn in einem Fall kein Hauptresektat existierte, sondern nur Probeexzisionen vorlagen, wurde die klinische TNM aus dem zugehörigen Arztbrief berücksichtigt. Bei Rezidiven wurde sofern vorhanden die TNM zum jeweiligen Präparat angegeben, aber auch jeweils die initiale TNM des Primarius. War zu einer Rezidivprobe keine erneute TNM angegeben, wurde die initiale TNM des Primarius verwendet. Es gehört angemerkt, dass sich die TNM Klassifizierung für Larynxkarzinome, Pharynxkarzinome und Karzinome der Mundhöhle u.a. in ihrer Bewertung des T-Stadiums unterscheidet. Zugunsten der Zahlen wurden diese Unterschiede bei der Auswertung jedoch nicht berücksichtigt. Die Einstufung erfolgte nach der jeweils gültigen TNM-Klassifizierung: TNM 6 (*AJCC Cancer Staging Manual 6th Edition, 2002* [91]) und 7 (*AJCC Cancer Staging Manual 7th Edition, 2010* [69]), da die Proben aus 2007-2011 stammen.

3.2.4 Therapie

In der Spalte Therapie wurde vermerkt, wenn der Patient und damit auch die Probe vor der Entnahme einer Chemotherapie oder/und Radiatio ausgesetzt war. Auch wenn es sich hierbei um die Behandlung eines anderen Tumors gehandelt hatte, dies aber z.B. aufgrund der Lokalisation für die Probe von Bedeutung war, wurde dies festgehalten und gesondert hervorgehoben. Die Art der operativen Behandlung und ob oder in welchem Ausmaß diese erfolgt war, wurde nicht explizit betrachtet bzw. erhoben.

3.2.5 *Rauchen*

Auf Basis der gesamten digitalen Patientenakte wurde versucht zu eruieren, ob der Patient der Noxe Tabakrauch ausgesetzt war. Leider zeigte sich die Dokumentation in unserer Datengrundlage dahingehend lückenhaft, sodass häufig keine Angabe erfolgen konnte. In einigen Fällen muss ein Tabakkonsum als sehr wahrscheinlich angenommen werden: z.B. bei Nebendiagnosen wie einer COPD oder bei späterem Auftreten eines Lungenkarzinoms. Diese Fälle bekamen das Merkmal „Hinweise auf Rauchen“ zugewiesen, wurden aber aufgrund der Uneindeutigkeit bei der späteren Auswertung nicht berücksichtigt. Als Raucher wurden nur Proben markiert, bei denen in den zugehörigen Diagnosen, der Anamnese oder Epikrise eindeutig ein Zigaretten- oder Tabakabusus als Risikofaktor (Synonym: *pack years*, Rauchen/Raucher, „Nikotin“ oder „Nikotinabusus“) angegeben waren.

3.2.6 *Alkohol*

Hier wurde analog zum Vorgehen beim Risikomerkmals Rauchen verfahren. Es wurden nur eindeutige Aussagen verwertet. Leider zeigte sich auch hier die digitale Dokumentation lückenhaft. Häufig konnte keine Angabe gemacht werden. Bei Diagnosen, wie z.B. einem Korsakow-Syndrom wurde der Alkoholkonsum als „anzunehmen“ notiert. Aufgrund der unzureichenden Datenlage wurde aber auch dieses Merkmal im Verlauf nicht näher ausgewertet.

3.2.7 *HPV*

Der HPV Status, der heutzutage eine Standarduntersuchung bei Karzinomen des Kopf-Halsbereiches darstellt und insbesondere beim Oropharynxkarzinom Einfluss auf das Tumorstaging und damit prognostische Bedeutung erlangt hat, wurde 2007-2011 leider nicht standardmäßig durchgeführt, sodass nur sehr selten eine Aussage diesbezüglich getroffen werden konnte. Positiv oder negativ wurde nur angegeben, wenn auch tatsächlich eine dokumentierte Testung erfolgt war. Die übrigen Fälle wurden als „keine Angabe“ mit dem Eintrag „k. A.“ gelistet. Aufgrund der ungenügenden Datenqualität wurde auch dieses Merkmal im Verlauf nicht weiter betrachtet und die HNSCC nicht nach HPV positiv oder negativ stratifiziert.

3.2.8 *Rezidiv*

Für die Beurteilung, ob es sich um ein Rezidiv handelte oder nicht, wurden die digitalen Krankenakte und insbesondere die pathologischen Fachberichte des Universitätsklinikums Marburg sowie die Arztberichte herangezogen. Es wurden die in

der klinischen Datenbank vorliegenden Einschätzungen der behandelnden Fachärzte verwendet. Allen Rezidiven gemein waren dieselbe Entität (Plattenepithelkarzinom, SCC) und die Zuordnung zum Kopf-Halsbereich, häufig im Bereich derselben oder bei ausgedehntem Befund einer räumlich benachbarten Lokalisation. Hieraus ergaben sich in etwa folgende Definitionskriterien für die Interpretation der Daten:

- Histologisch gleichartige/gleiche Entität (Plattenepithelkarzinom, SCC)
- Räumlicher Bezug von Primarius und Rezidiv: „gleicher Ort“
- Wiederauftreten/Progress nach vorausgegangener radikaler Behandlung mit einhergehender Remission.

Es ist nicht auszuschließen, dass es im Verlauf der hier untersuchten Patientenfälle zu Rezidiven gekommen ist, die nicht in der HNO-Klinik der Philipps-Universität Marburg erfasst wurden. Mögliche Gründe hierfür können unter anderem eine nicht fortgeführte Nachsorge oder die Behandlung in anderen Kompetenzzentren sein sowie der Tod des Patienten bzw. der Patientin.

3.3 Entscheidungsalgorithmus (Entscheidungsbaum) zur Auswahl des Kollektivs

Abbildung 1 zeigt die Definition des Patientenkollektivs anhand eines Entscheidungsalgorithmus.

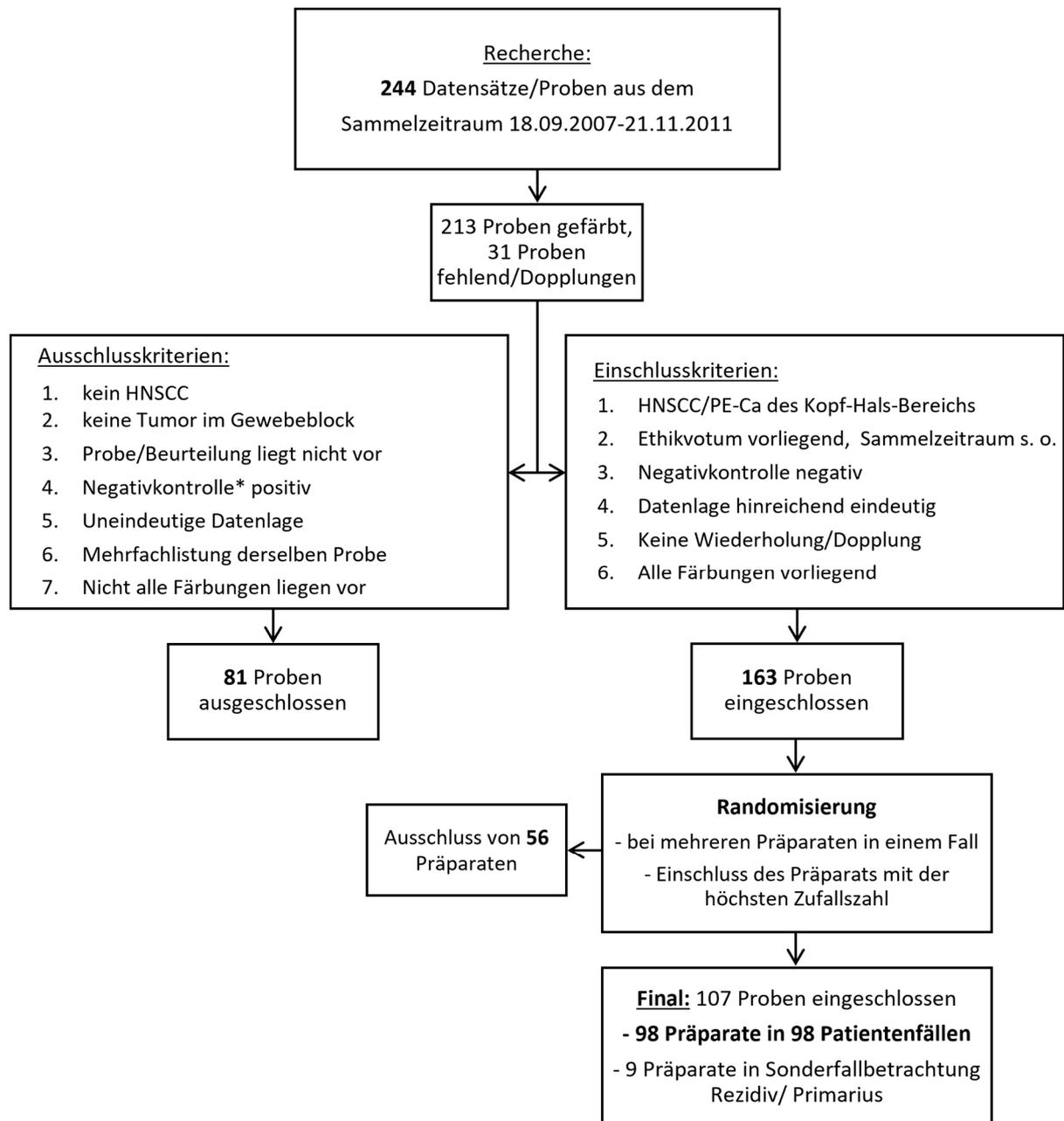


Abbildung 1. Flussdiagramm: HNSCC – Gewinnung des Kollektivs

* Kontrollschnitt ohne Primär-Antikörper gefärbt

3.4 Immunhistochemie nach der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex-Methode)

Die Immunhistochemische Färbung erfolgte nach einem im Labor etablierten Protokoll. Die Proben wurden uns in Form von Paraffinblöcken vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden mittels eines Mikrotoms ca. 4 µm dünne Schnitte der vorgekühlten (-20°C) Paraffinblöcke angefertigt und mittels eines Wasserbades (37°C) auf Objektträger übertragen. Anschließend wurden die Schnitte für mind. 60 min bei 60°C getrocknet. Um die gewünschten Gewebe den Untersuchungen zugänglich zu machen, wurden die getrockneten Schnitte entparaffiniert. Hierzu wurden sie zunächst für 30 min bei 60°C erwärmt und anschließend für 30 min in ROTI®Histol eingelegt. Nachfolgend wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100%, 90%, 70%) behandelt und in einer 30%igen Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung (200 ml Methanol, 6 ml H₂O₂) inkubiert. Wasserstoffperoxid wurde erst kurz vor Verwendung der Lösung hinzugegeben. Ziel dieses Schrittes war es die Aktivität endogener Peroxidasen durch das Überangebot von Peroxiden zu blockieren, um später spezifischere Färbeergebnisse zu erreichen. Nach dreimaligem Spülen in Aqua dest. für je 5 min wurden die Präparate zur Demaskierung der Antigene in eine Schale mit vorgewärmtem 0,01-mol/l Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat-Puffer überführt und für 15 min unter regelmäßigen Spiegelkontrollen bei 92-95°C darin inkubiert. Nach Abkühlen bei Raumtemperatur für mind. 15 min wurden die Präparate mit TBS-Puffer für 30 min gespült. Die Schnitte wurden anschließend mit einem Fettstift umrandet, um ein Herablaufen der anschließend aufgetragenen Lösungen zu verhindern. Um unspezifische Antikörperreaktionen u.a. mit Kollagen zu minimieren, wurde für 30 min ein Normalserum der Spezies des anschließend verwendeten Sekundärantikörpers (bei ABCC2 und ABCG2 z.B. Ziegen-Serum (*goat serum*) bei Sekundärantikörper *goat-anti-mouse*) in einer Verdünnung von 1:10 in 0,15%igem PBS aufgetragen (pro Schnitt je 100 µl). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Das Serum wurde anschließend vorsichtig abgekippt und es wurden direkt ohne zusätzlichen Waschschrift 100 µl des jeweiligen Primärantikörpers in entsprechender Konzentration aufgetragen: Die Primärantikörper gegen ABCC2, ABCG2, p53 und Cytokeratin 19 wurden mit *Antibody Diluent* auf 1:100 verdünnt, der gegen Ki-67 gerichtete Antikörper auf 1:50. Als Kontrolle diente *normal-mouse-IgG*, welches ebenfalls auf 1:100 verdünnt wurde (Negativ-Reagenz-Kontrolle). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurde nach einmaligem Spülen für 5 min in PBS der Sekundärantikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtete war,

aufgetragen. Hierbei wurde standardmäßig eine Konzentration von 1:100 und eine Inkubationszeit von 30 min verwendet. Der Sekundärantikörper war mit HRP konjugiert. Nach erneuter Spülung mit PBS für maximal 5 min wurde der ABC-Komplex, bestehend aus Avidin und einem Biotin-markierten Enzym aufgebracht und für 30 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Der Komplex wurde nach Herstellerangaben angesetzt, nach frühestens 30 min war er verwendbar und war nach Herstellung ca. 12 Tage im Kühlschrank haltbar. Nach erneutem Spülen mit PBS wurde für die braune Farbreaktion DAB als Chromogen entsprechend den Herstellerempfehlungen und etablierten Laborprotokollen hinzugegeben. Nach dem Auftropfen des Chromogens wurden die Schnitte für weitere 12-15 min inkubiert. Die Schnitte wurden kurz unter fließendem Leitungswasser gespült, anschließend in destilliertem Wasser. Nach Gegenfärbung mit Hämalaun für max. 1 min, wurden die Proben erneut kurz gewässert. Hierbei wurde das Wasser mind. zweimal ausgetauscht. Nach 2 min in H₂O wurden die Präparate mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe fixiert (aqua dest. ca. 8-10 Sek., Ethanol 70% ca. 8-10 Sek., 90% 2 min, 100% 3 min) und 15 min in ROTI®Histol behandelt. Nach Eindecken mit Corbitbalsam und Trocknen wurden die Präparate unter einem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg Deutschland) untersucht. Die Zweitbegutachtung und abschließende Auswertung erfolgte im Institut für Pathologie durch eine erfahrene Pathologin. Die Fotodokumentation erfolgte an einem Zeiss Axio Imager 2 Mikroskop mittels einer Zeiss HRC Kamera und der Mikroskopie-Software Axiovision (Rel. 4.8.).

3.5 Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte durch eine erfahrene Pathologin. Zur Bewertung des Färbeergebnisses wurde nach Vorbild der Arbeitsgruppe um Lage und Surowiak [224], angelehnt an den insbesondere in der Gynäkologie etablierten IRS nach Remmele und Stegner (*immunoreactive score* (engl.)) [184], die Farbintensität (SI, *staining intensity* (engl.)) und der Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen innerhalb der Tumormasse (PP) bewertet. Die Farbintensität wurde mit 0-3 Punkten bewertet: 0 für ein negatives Färbeergebnis, 3 für ein stark positives Signal, sowohl für zytoplasmatische als auch nukleäre Färbesignale. Weiter wurde der Prozentsatz an positiven Zellen im Verhältnis zur Tumormasse abgeschätzt und in Abhängigkeit des jeweiligen Antigens/Proteins in sinnvolle Prozentgruppen 0-4 eingeteilt, diese sind Tab. 1 zu entnehmen. 0 entsprach einem negativen Ergebnis.

Tabelle 1. Semiquantitative Beurteilung und Immunreaktiver Score

Parameter	Färbungen					
Bewertung	0	1	2	3	4	
Farbintensität (SI)	Alle Färbungen	keine	schwach	mäßig	stark	/
Positive Zellkerne/Zellen in % vom Tumor (PP= percentage points)	keine	schwach	mäßig	stark	sehr stark	
	ABCC2	keine	≤ 10%	11-50%	51-79%	≥ 80%
	ABCG2	keine	≤ 10%	11-50%	51-79%	≥ 80%
	CK19	keine	≤ 10%	11-50%	51-79%	≥ 80%
	Ki-67	keine	≤ 10%	11-30%	31-50%	> 50%
	p53	keine	≤ 10%	11-50%	51-79%	≥ 80%
Nukleär/zytoplasmatisch	Alle Färbungen					

Aus beiden Zahlenwerten wurde anschließend ein Score gebildet, der beide Qualitätsparameter des Färbeergebnisses zu einem Zahlenwert zusammenführte. Es wurde das Produkt beider Werte gebildet. Der maximal erreichbare Score lag bei 12 Punkten (Immunreaktiver Score (IRS) = Farbintensität (SI) x Prozentsatz positiver Tumorzellen/Tumormasse) (Abb. 2).

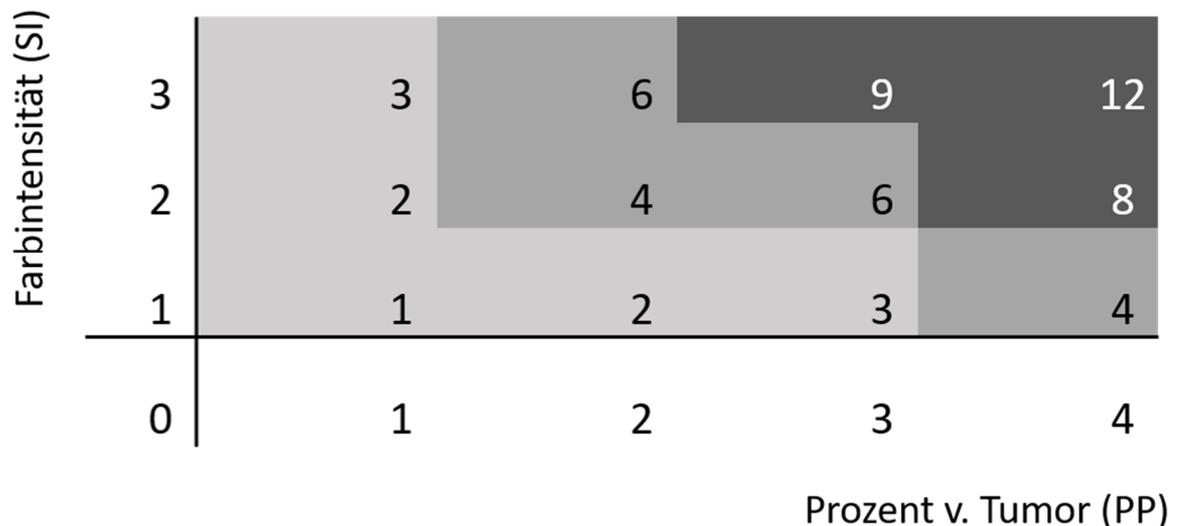
**Abbildung 2.** Immunreaktiver Score (IRS) - Ergebnisse und Bewertungsgruppen

Abbildung 2 zeigt die möglichen Ergebnisse des Scores und ihre Bewertung als schwach, mäßig, stark: Ein Score von 0 war negativ. Alle Ergebnisse ≥ 1 wurden zunächst als positiv gewertet. Ein Score von 1-3 entsprach einer schwachen Expression (hellgrau). Ein mäßiges Färbeergebnis lag bei einem Score von 4 oder 6 vor (mittelgrau). Ab einem Score von 8 wurde das Signal als stark gewertet (dunkelgrau). Ab einem Score von 4 lag eine deutliche Überexpression vor.

Für p53 und die ABC-Transporter wurde auch die nukleäre und zytoplasmatische Verteilung des Signals betrachtet, hierzu wurde der Score jeweils für das nukleäre und das zytoplasmatische Signal bestimmt, sofern ein Signal vorlag. Anschließend wurden die Färbeergebnisse untereinander und mit klinischen Daten korreliert und zwischen Primärtumor (sensitiv?) und Rezidiv (resistentere Tumore?) unterschieden.

3.6 Statistische Analyse

Alle Berechnungen für die deskriptive Statistik, wie Mittelwert, Standardabweichung, Median und Standardfehler wurden mittels Microsoft Excel (Office 365, Version: 16.0.12730.20270) berechnet. Die immunhistologischen Daten wurden wie beschrieben in Excel gesammelt und aufbereitet. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt. Mithilfe der Kreuztabellen-Analyse wurden die Zusammenhänge zwischen Marker-Expression und klinischen Daten der Kollektive untersucht. Sie dient als Signifikanztest auf Unabhängigkeit der untersuchten Gruppen (z.B. Männern und Frauen, HNSCC und Kontrollen) bzw. der Feststellung, ob eine signifikante Assoziation zwischen zwei oder mehr kategorialen Variablen (z.B. Geschlecht, Altersgruppen, Score-Ergebnis) vorliegt oder nicht. Die angewendeten Tests waren der Chi-Quadrat-Test sowie für geringere Fallzahlen der Exakte-Test-nach-Fisher sowie der Freeman-Halton-Test als Erweiterung des Exakten-Test-nach-Fisher für größere Kontingenztabelle. Die Berechnungen des Chi-Quadrat-Tests erfolgten mittels der in Microsoft Excel implementierten Tools (Office 365, Version: 16.0.12730.20270, aktualisiert: 21.05.2020), die Berechnungen des Fishers-Exact-Tests und die "*Exact Contingency Table*"-Analyse nach der Freeman-Halton-Extension erfolgten über die in der gemeinsamen Online-Präsenz des College of Saint Benedict und der Saint John's University Minnesota bereitgestellten statistischen Berechnungstools [118]:

http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact_NROW_NCOLUMN_form.html

<http://www.physics.csbsju.edu/stats/fisher.form.html>

Alle Berechnungen erfolgten auf Basis der absoluten Zahlen (Anzahl n bzw. N). Die sich hieraus ergebenden p -Werte sind unter der jeweiligen Abbildung und im Fließtext im Rahmen der Ergebnisinterpretation im jeweiligen Kapitel angegeben.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Folgenden sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von 98 Präparaten der 98 HNSCC-Patienten dargestellt. Mittels der ABC-Methode wurden die Präparate mit verschiedenen Primärantikörpern auf die Expression von ABCC2, ABCG2, CK19, Ki-67 und p53 untersucht und die Ergebnisse mit klinischen Daten korreliert.

4.1 Betrachtung des Kollektivs

Die Fallzahl n=98 wurde bei der Betrachtung des Kollektivs als Gesamtzahl verwendet und auch für alle Prozentberechnungen zu Grunde gelegt, bei denen sich auf die Gesamtmenge bezogen wurde. In 9 Fällen lagen uns Rezidiv und Primarius vor. Tabelle 13 im Anhang fasst diese zusammen.

Insgesamt spiegelte unser Kollektiv die Deutsche Gesellschaft zufriedenstellend wider. Unsere Patienten waren bei Erstdiagnose im Schnitt etwas jünger und der Anteil an Männern lag mit 86% höher als der bundesdeutsche Prozentsatz von 74% der HNSCC-Patienten.

Tabelle 2 fasst die Charakteristika des Kollektivs übersichtlich zusammen, die im Folgenden näher dargestellt werden.

Tabelle 2. Charakteristika des Patientenkollektivs (98 Fälle) - Übersicht

Parameter		Anzahl Fall (n)	Anteil von Gesamt (%)	
Altersverteilung (in Jahren)	<55	30	30,6%	
	55-65	38	38,8%	
	>65	30	30,6%	
Alter (Gesamt)	Median	59,5 J.		
	Mittelwert (+/- STABW)	60,5 J. (+/- 9,6)		
Alter (Männer)	Median	60,5 J.		
	Mittelwert (+/- STABW)	60,8 J. (+/- 9,8)		
Alter (Frauen)	Median	58 J.		
	Mittelwert (+/- STABW)	59 J. (+/- 8,7)		
Geschlecht	männlich	84		85,7%
	weiblich	14		14,3%
Lokalisation	Mundhöhle	10	10,2%	
	Pharynx	41	41,8%	
	Nasopharynx	1	1%	
	Oropharynx	22	22,4%	
	Hypopharynx	18	18,4%	
	Larynx	47	48%	
T	T1	32 (+2*)	32,7%	
	T2	29	29,6%	
	T3-4	34 (+1*)	34,7%	
N	N+	43	43,9%	
	N0	46	46,9%	
	Nx	9	9,2%	
M	M1	2	2%	
	M0	55	56%	
	Mx	41	42%	
Grading	G1	8	8,2%	
	G2	73	74,5%	
	G3	17	17,3%	
	G4	0	0%	
Rezidiv	Rezidiv (98 / 107)	21 / 25	21,4% / 23,4%	
	Primarius (98 / 107)	77 / 82	78,6% / 76,6%	
Vorbehandelt?	ja	12	12,2%	
	nein	86	87,8%	

*In 3 Patientenfällen erfolgte für das Rezidiv ein erneutes *Staging*. Der Vollständigkeit halber sind in Klammern die T-Stadien der aus der Auswertung entfallenen Präparate aufgelistet.

4.1.1 Alter

In Abbildung 3 ist die Altersverteilung der Patient*innen (bei Erstdiagnose) zu den jeweils eingeschlossenen 98 Proben abgebildet. Die von uns untersuchten Patient*innen waren zwischen 35 und 81 Jahre alt. Es zeigte sich ein *Peak* bei ca. 57 Jahren und insgesamt eine Häufung von Erstdiagnosen (ED) zwischen 50 und 65 Jahren. Auch in der Literatur wird ein Häufigkeitsgipfel zwischen 55 und 65 Jahren beschrieben [147, 215].

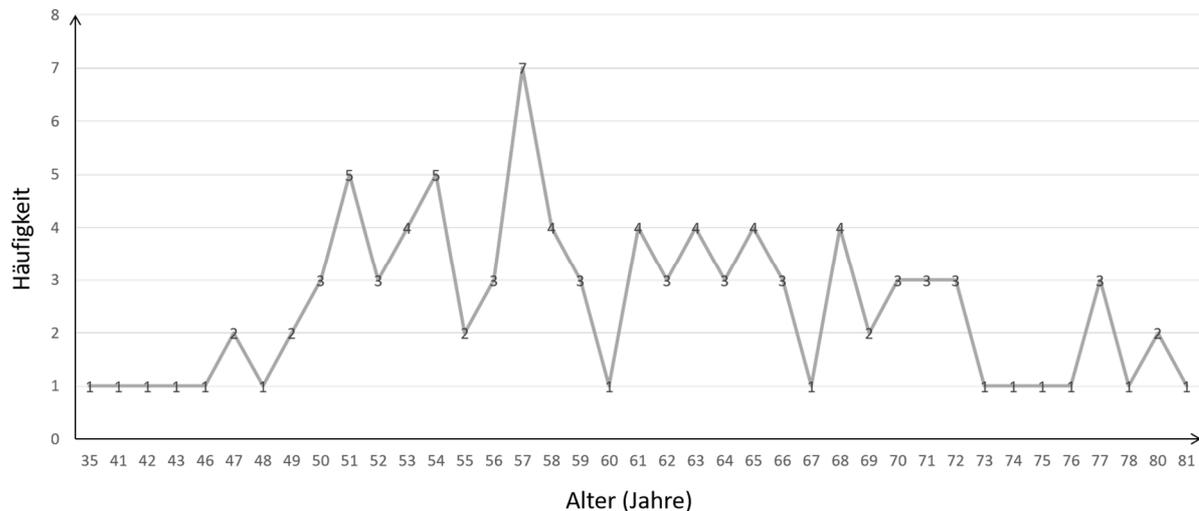


Abbildung 3. Altersverteilung im Patientenkollektiv

Unsere Daten spiegeln in etwa die Inzidenz in der deutschen Bevölkerung wider: In Deutschland erkrankten die Patient*innen im Jahr 2012 im Durchschnitt im Alter von 66,2 Jahren an einem Tumor des Kopf-Hals-Bereichs (Mundhöhle und Lippe, Pharynx, Larynx). Männer im Durchschnitt früher als Frauen: 63,8 J. vs. 66,2 Jahre (Daten aus dem Jahr 2012/13) [258]. Dieses Bild kehrt sich jedoch, wenn man Larynxkarzinome separat betrachtet: In diesem Fall waren die Frauen bei Erstdiagnose durchschnittlich 2 Jahre jünger: Frauen 64 J., Männer 66 J. (GEKID, RKI-Daten 2007-2012, [259-261]). Im von uns untersuchten Kollektiv waren die eingeschlossenen Männer bei Erstdiagnose im Mittel 60,8 Jahre und Frauen 59 J. alt, somit war unser Kollektiv bei Erstdiagnose jünger als der bundesdeutsche Durchschnitt. Allerdings werden bei den Daten des RKI auch Patient*innen mit eingerechnet, deren Erkrankung dem Krebsregister erst durch die Totenbescheinigung bekannt wurde, in diesen Fällen wurde der Todestag als Tag der Ersterkrankung angegeben, was eher zu einer Überschätzung des Erkrankungsalters führt (GEKID, RKI-Daten 2007-2012, [259-261]).

Patient*innen mit einem Larynxkarzinom erkrankten durchschnittlich im Alter von 63,7 (+/-9,6) Jahren, das mediane Erkrankungsalter war 63 Jahre. Männer erkrankten

hierbei später, im Alter von 64,6 (+/- 9,4) Jahren, Frauen früher, mit 57,3 (+/- 7,78) Jahren. Damit war unser Larynxkarzinom-Kollektiv gemittelt jünger als der deutsche Durchschnitt in den Jahren 2007/2008 mit einem Durchschnittsalter bei Erstdiagnose von 65 Jahren [259].

Die Patient*innen mit einem Pharynx- oder Mundhöhlenkarzinom waren bei ED jünger als die Patient*innen mit einem Larynxkarzinom: Sie waren im Durchschnitt 57,6 (+/- 8,8) Jahre alt, das mediane Alter lag bei 57 Jahren. Männer erkrankten durchschnittlich mit 57,2 Jahren (+/- 8,6; Median: 57), Frauen mit 60,3 Jahren (+/- 9,1; Median: 58). Auch hier war unser Kollektiv jünger im Vergleich zu den deutschlandweiten Daten des RKI: Männer erkrankten in Deutschland im Durchschnitt im Alter von 61 Jahren, Frauen im Alter von 65,5 Jahren [259].

Patienten unseres Kollektivs mit einem Primarius waren bei Diagnosestellung im Durchschnitt jünger (59,8 Jahre +/- 9,5; Median: 58 J.) als Patienten mit einem Rezidiv (63 Jahre +/- 9,5; Median: 65 Jahre).

Für die weitere Betrachtung wurden 3 vergleichbar große Altersgruppen gebildet. Die Anzahl der Fälle verteilte sich über die Gruppen wie in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. Altersgruppen im Patientenkollektiv

<i>Altersgruppen</i>	<i>Anzahl Fälle</i>	<i>Fälle in Prozent</i>
<55	30	30,6%
55-65	38	38,8%
>65	30	30,6%
<i>gesamt</i>	<i>98</i>	<i>100%</i>

4.1.2 *Geschlecht*

Es erkranken in Deutschland jährlich ca. 17.000 Menschen an einem Kopf-Hals-Karzinom. Davon sind 26% Frauen und mit 74%, etwa 3x so viele Männer [258].

In 86% der von uns eingeschlossenen 98 Fälle handelte es sich um Männer (n=84) und in 14% um Frauen (n=14) (Abb. 4). Damit lag der Anteil an männlichen Patienten in unserem Kollektiv deutlich über dem bundesweiten Prozentsatz von 74%. Diese Abweichung könnte auf das, auch mit n=98, noch immer kleine Kollektiv zurückzuführen sein, da kleinere

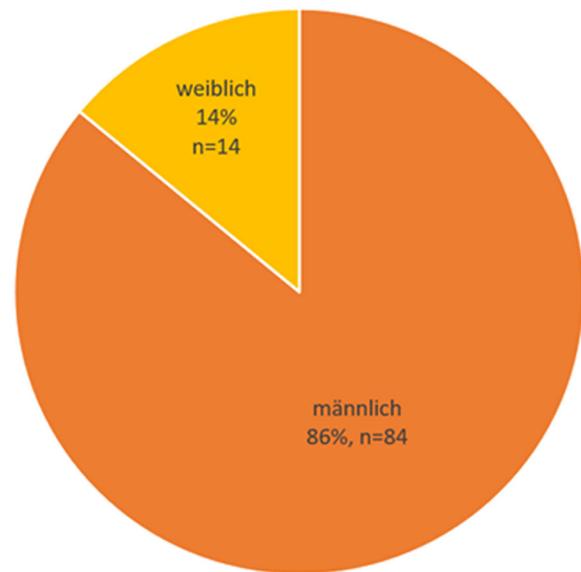


Abbildung 4. Geschlechterverteilung im Patientenkollektiv (n=98)

Stichproben zufallsbedingte Schwankungen begünstigen. Allerdings ist anzumerken, dass das Geschlechterverhältnis je nach Literatur und in Abhängigkeit der Tumorlokalisation stark variiert, es finden sich Verhältnisse zwischen 2:1 und 15:1 (m:w) [215]. Festzuhalten bleibt, dass Männer häufiger als Frauen an einem Tumor des Kopf-Hals-Bereichs erkranken. Unsere Daten sind diesbezüglich konsistent mit der aktuellen Datenlage.

4.1.3 *Rauchen, Alkohol und HPV Status*

Aufgrund der verwendeten Methodik, einer retrospektiven Analyse klinischer Daten aus den vorhandenen Krankenakten, zugehörig zu den von uns untersuchten zuvor gewonnenen Tumorgewebeproben, war es leider nicht möglich eine vollständige Datenerhebung durchzuführen. In 67% der Fälle konnte aufgrund unzureichender Datenqualität keine Aussage getroffen werden, ob der Patient der Noxe Tabak ausgesetzt war. Bezüglich eines Alkoholkonsums war in 81% der Fälle keine Angabe in der Patientenakte zu finden. Insgesamt erscheint es sinnvoll im klinischen Betrieb und der medizinischen Dokumentation genauer auf eine Vollständigkeit solch wichtiger anamnestisch abfragbarer Risikofaktoren zu achten.

Die Erhebung des HPV-Status, die insbesondere bei Oropharynxkarzinomen, spätestens seit TNM 8, Teil der Prognoseeinschätzung ist, wurde 2007-2011 leider nicht standardmäßig durchgeführt, sodass nur sehr selten eine Aussage getroffen werden konnte. In 88% lag keine Angabe zum HPV-Status vor. Leider konnten wir

daher bezüglich dieser in der Pathogenese der HNSCC wichtigen Risikofaktoren und ihrer möglichen Beziehung zur Expression der von uns untersuchten Marker sowie ihrer prognostischen Bedeutung keine fundierten Beobachtungen machen.

Im Folgenden ist die Verteilung der Merkmale Rauchen, Alkohol-Anamnese und HPV-Status in den von uns untersuchten Patient*innen graphisch dargestellt.

4.1.3.1 **Tabakkonsum**

Aufgrund der unvollständigen Datenlage wurde das Merkmal „Rauchen“ (Abb. 5) in den folgenden Analysen nicht weiter betrachtet.

4.1.3.2 **Alkohol-Anamnese**

Bezüglich der Noxe Alkohol konnten ebenfalls nur wenige Daten zusammengetragen werden (Abb. 5). Nur in 19% der Fälle lag eine verwertbare Angabe zum Thema Alkoholkonsum vor. Aufgrund der ungenügenden Datenlage erfolgten keine weiteren Betrachtungen.

4.1.3.3 **HPV Status**

Ebenfalls in Abbildung 5 ist der ermittelbare HPV-Status der Fälle zu den eingeschlossenen Proben dargestellt. Nur in 12% der Fälle lag eine verwertbare Aussage vor. Aufgrund der spärlichen Datenlage erfolgten keine weiteren Betrachtungen bezüglich des HPV-Status.

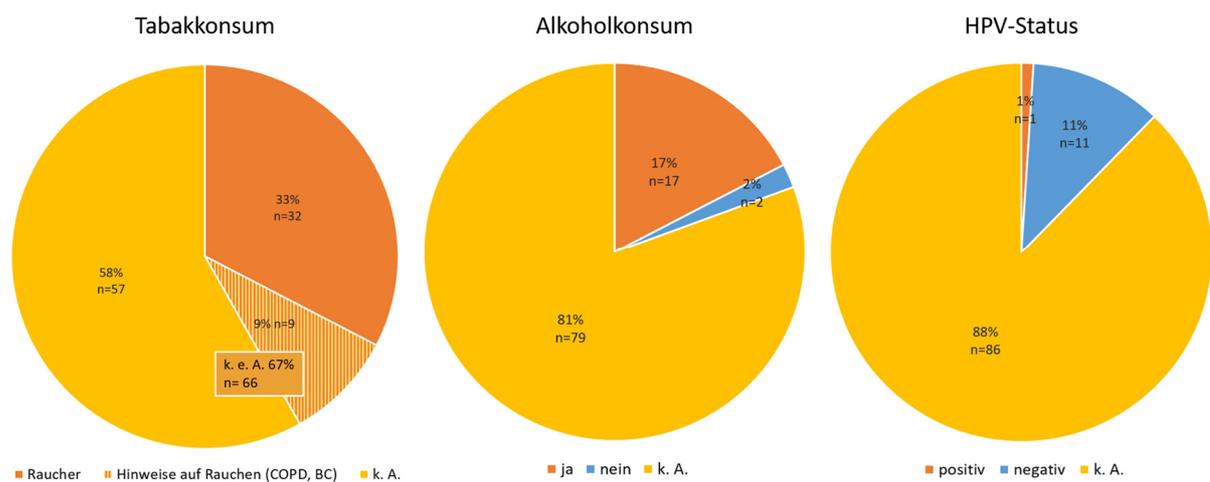


Abbildung 5. Erhebungen im Patientenkollektiv zu Tabakkonsum, Alkoholkonsum und HPV-Status (n=98). Abkürzungen: COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*; BC, Bronchialkarzinom

4.1.4 TNM und Grading

Der Großteil der von uns untersuchten Proben war bereits bei Erstdiagnose fortgeschritten verändert. 91,9% der Tumoren lagen in einem G2-G3 Stadium vor, 74,5% waren mäßig-differenziert. Unsere Kohorte war je zu einem Drittel T1, T2 oder T3-4. 43,9% wiesen Lymphknotenmetastasen auf (N+). Bezüglich der Fernmetastasierung bestand keine gute Datenqualität, in 42% der Fälle waren die Angabe MX oder keine Angabe (k. A.) zu finden. 56% waren M0.

Bezüglich der TNM-Klassifizierung muss angemerkt werden, dass bereits in der vom UICC empfohlenen Klassifikation, welche 2010 veröffentlicht wurde von der Angabe MX Abstand genommen wurde. Sofern dem Pathologen das klinische M-Stadium nicht bekannt ist, soll MX nicht in das *Staging* aufgenommen werden, sondern vollständig auf die Angabe verzichtet werden. Laut TNM 7 existieren die Angaben pMX und pM0 nicht, ebenso wie MX oder cMX. Die Einschätzung der Fernmetastasierung erfolgt klinisch (körperliche Untersuchung und bildgebend) außer im Falle einer Autopsie [69]. Aufgrund der für unsere Datenrecherche im Vorfeld erfolgten Festlegung, die pTNM als ideale TNM anzugeben, lag uns häufig keine Angabe über M vor. Nicht weniger häufig war im Entlassbrief keine TNM-Angabe enthalten.

Die Häufigkeit der Angabe MX oder NX lässt zudem darauf schließen, dass eine engere Zusammenarbeit von Klinikern und Pathologen wünschenswert wäre. Im Idealfall sollte dem Pathologen bei seiner Beurteilung der Gewebeprobe bereits das klinische *Staging* bekannt sein. Natürlich kann dies im Falle einer Erstdiagnose mit Probebiopsieentnahme, bei der das *Staging* häufig erst nach Erhalt des pathologischen Ergebnisses erfolgt, nicht gewährleistet werden.

In unserer Erhebung wurde noch die zum Zeitpunkt der pathologischen Untersuchung gültige TNM 6 bzw. 7 als Standard der Beurteilung verwendet. Die aktuell gültige TNM Klassifizierung ist die achte Edition [13], in der es insbesondere beim Oropharynxkarzinom aufgrund des aktuellen Forschungsstandes zu weitgehenden Veränderungen kam. Nach dieser ist es mittlerweile Standard das Humane Papillomavirus 16 (HPV 16 oder seinen Surrogatmarker p16) immunhistochemisch zu bestimmen und ggf. um einen direkten HPV-DNA-Nachweis zu ergänzen. Die T- und N-Einstufung unterscheidet sich je nach p16 Status deutlich [13]. In unserem Sammelzeitraum war die p16 Bestimmung noch nicht standardmäßig etabliert, daher ergibt sich in unserem Kollektiv eine diesbezüglich unzureichende Datenlage, sodass hier rückblickend keine Schlüsse zu ziehen sind, wie bereits in Kapitel 4.1.3 kommentiert.

Aufgrund der sonst sehr kleinen Fallzahlen wurde zudem nicht zwischen den verschiedenen Tumorentitäten unterschieden, obwohl sich die TNM-Klassifikationen der jeweiligen Tumore teilweise unterscheiden.

Das AJCC empfiehlt aktuell, allgemein in wissenschaftlichen Analysen eher klinische Stadien nach UICC zu verwenden, und T, N und M nicht getrennt zu betrachten. Hierbei wird sich aber nicht speziell auf immunhistochemische Korrelations-Analysen bezogen. Die Erfassung des UICC Stadiums war in unserer Arbeit nicht standardmäßig erfolgt und auch nur selten den Arztberichten zu entnehmen.

Im Folgenden wird die Verteilung von T-, N- und M-Stadium sowie des *Gradings* im Kollektiv genauer beschrieben.

4.1.4.1 **Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors (T)**

Bezüglich des T-Stadiums waren T1 (n=32) und T2 (n=29) mit je ca. einem Drittel der Fälle bei Erstdiagnose ungefähr zu gleichen Teilen vertreten. 15 Fälle wiesen bei Diagnosestellung ein T3-Stadium auf (15,4%), 19 Fälle ein T4-Stadium (19,4%). Bei 3 Fällen lagen unzureichende Angaben vor, so dass die Tumorgößenverteilung (T1-4) aus den verbleibenden 95 Präparaten erfolgte (Abb. 6). Zugunsten eines ausgeglicheneren Zahlenverhältnisses wurden für die weiteren Auswertungen die fortgeschritteneren Stadien T3 und T4 in T3-4 (n=34) zusammengefasst, wodurch sich vergleichbar große Gruppen ergaben.



Abbildung 6. Klassifikation der Tumorgößen-Verteilung (T1-4) Nur für 95 Präparate lag eine eindeutige Angabe für T vor, in 3 Fällen wurde Tx/k. A. angegeben.

4.1.4.2 **Regionäre Metastasierung (N)**

In 43 von 98 Fällen lag eine regionäre Lymphknoten-Metastasierung vor. In 9 der 98 Fälle konnte keine Aussage getroffen werden („Nx“ oder „keine Angabe“). Diese 9 Fälle wurden in den folgenden Auswertungen nicht weiter berücksichtigt. Angaben zu Lymphknotenmetastasen wurden als vorhanden (N+) oder nicht nachgewiesen (N0) deklariert (Abb. 7). Für die weiteren Auswertungen wurden nur die Proben mit einer eindeutigen Aussage (N+ oder N0) miteinander verglichen (n=89).

4.1.4.3 Fernmetastasierung (M)

Bezüglich der Fernmetastasierung (M) lag eine unzureichende Datenlage vor: In nur 2% aller Fälle konnten Fernmetastasen (M1) eindeutig nachgewiesen werden, 55% zeigten keine Fernmetastasen (M0) und für 43% der Fälle konnten anhand der pathologischen Berichte sowie der Arztbriefe keine eindeutigen Aussagen getroffen werden (Abb. 7).

4.1.4.4 Differenzierungsgrad (G)

Drei Viertel der eingeschlossenen HNSCC waren bei Erstdiagnose mäßig differenziert (G2, 75%) (Abb. 7). Bei 17 von 98 Fällen (17%) lag ein schlecht- bzw. gering-differenziertes Plattenepithelkarzinom vor (G3). Nur 8% waren bei Erstdiagnose gut differenziert mit großer Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe. Ein undifferenziertes G4-Stadium lag bei keiner der Proben vor.

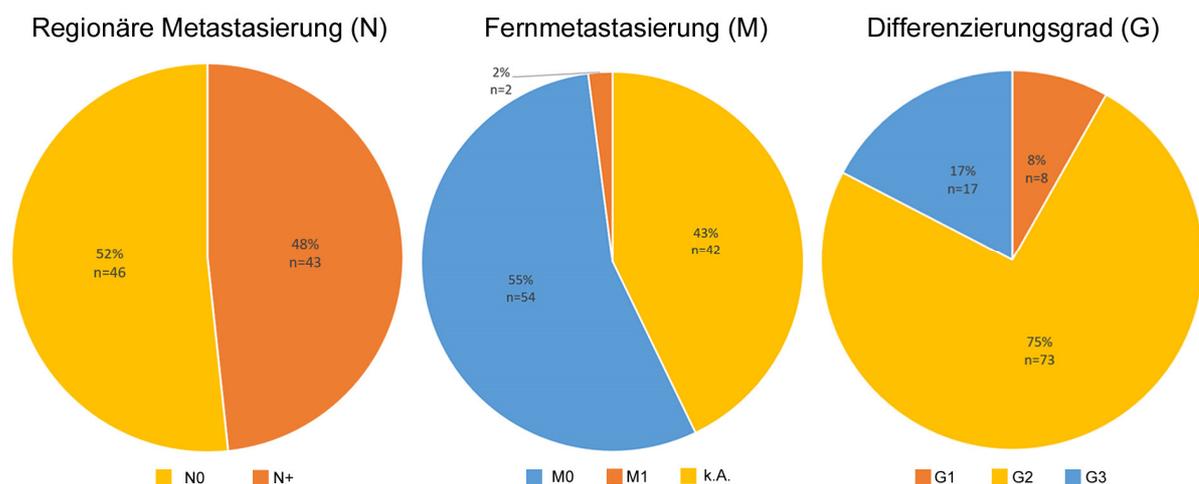


Abbildung 7. Auftreten von regionären Metastasen (N), Fernmetastasen (M) und Differenzierungsgrad (G) basierend auf der Befunderhebung. Zusammensetzung des N+ Kollektivs: 8 Proben mit N1; 34 Proben mit N2; 1 Probe mit N+.

4.1.5 Lokalisation

In den Abbildungen 8 und 9 ist die Verteilung der Proben entsprechend ihren anatomischen Lokalisationen dargestellt. Es ist anzumerken, dass die verschiedenen Lokalisationen sich durchaus in vielen Aspekten unterscheiden, u.a. in ihrer Pathogenese, ihrem Metastasierungsverhalten und auch in ihrem klinisch-therapeutischen Verhalten [17, 215]. Bei dem Großteil der in dieser Studie eingeschlossenen Patient*innen bzw. Proben handelte es sich um Larynxkarzinome (48%, n=47), während z.B. die einzelnen Pharynxabschnitte mit 1 bis 22 Proben maximal 22% in den Subgruppen erreichten. Auch die Mundhöhlenkarzinome waren mit 10% eher unterrepräsentiert. Aufgrund dieses Ungleichgewichts wurden die

Pharynxkarzinome und Mundhöhlenkarzinome für die weiteren Auswertungen zusammengefasst (Abbildungen 8 und 9). Dass aus dem Bereich der Mundhöhle in unserem Kollektiv nur 10 Präparate vorlagen, irritierte, da weltweit die Anzahl der Fälle und die Inzidenz von Mundhöhlenkarzinomen vor der von Pharynx- und Larynxkarzinomen liegt [29]. Allerdings werden bei Bray et al. Lippenkarzinome mit denen der Mundhöhle zusammengefasst. Zudem zeigen Karzinome der Lippe und der Mundhöhle eine deutliche Hoch-Risiko-Clusterbildung in Südostasien (u.a. Indien und Sri Lanka) und den Pazifischen Inseln, von denen Papua-Neuguinea mit der weltweit höchsten Inzidenz in beiden Geschlechtern auffällt [29]. Hierbei spielt das Kauen der Betelnuss (*Areca nut*) bzw. von *betel quid*, einer Zubereitung aus dieser, als zusätzlicher Risikofaktor eine wesentliche Rolle [29]. In den aus Deutschland vorliegenden Daten des GEKID und des RKI werden Karzinome der Mundhöhle und Lippe mit denen des Rachens zusammengefasst [259, 262], was den Vergleich mit den weltweiten Daten von Bray et al. [29] erschwert. Deutschland lag 2015-2016 im internationalen Vergleich (Europa und USA) bezogen auf die Inzidenz von Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens für Männer an 5. und für Frauen an 6. Stelle, hinter Frankreich, Belgien und Dänemark, aber vor den USA. Im Vergleich der Inzidenz von Larynxkarzinomen derselben Länder belegte Deutschland bei den Männern Platz 6, bei den Frauen Platz 8 [262].

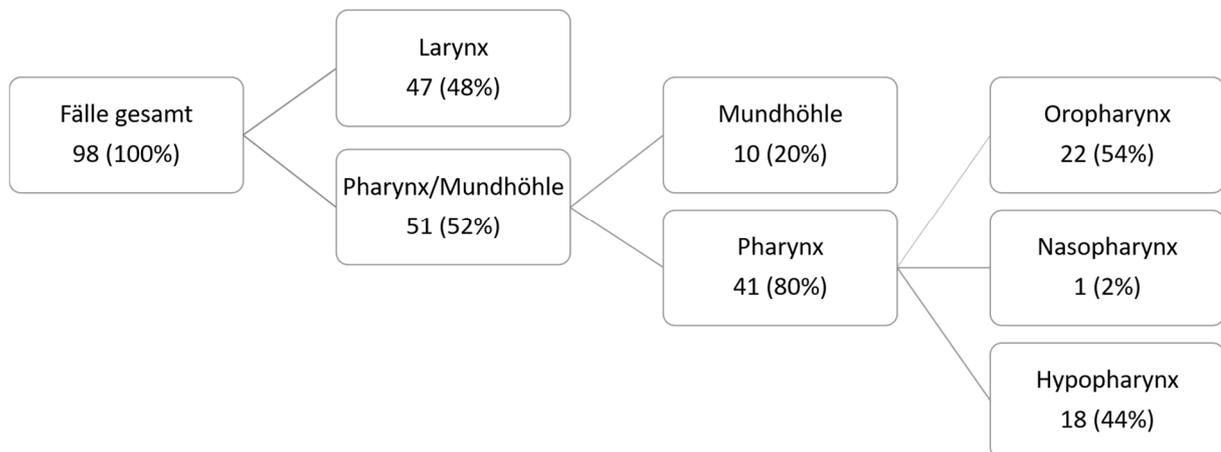


Abbildung 8. Verteilung der Kopf-Halskarzinome entsprechend ihrer anatomisch-topographischen Lage
Verteilung der Fälle auf die entsprechenden Tumorlokalisationen/Entitäten mit Angabe der Anzahl n und jeweiligen Prozent als Flussdiagramm, Pharynx- und Mundhöhlenkarzinome wurden zusammengefasst.

In unsere Kohorte konnte ein Fall mit einem Nasopharynxkarzinom eingeschlossen werden. Dies entsprach der erwarteten Häufigkeit, da Nasopharynxkarzinome mit einer geschätzten weltweiten Neuerkrankungsrate von 84.400 Fällen (2008) vergleichsweise selten sind. Das Haupterkrankungsalter bei Nasopharynxkarzinomen liegt je nach Ethnie zwischen 48 und 58 Jahren, in Deutschland ca. bei 60 J. [215]. Der von uns eingeschlossene Fall war bei Diagnosestellung 53 Jahre alt.

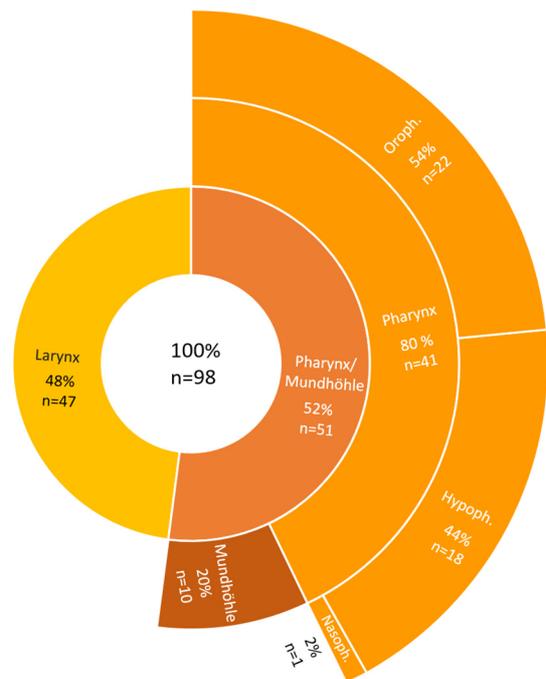
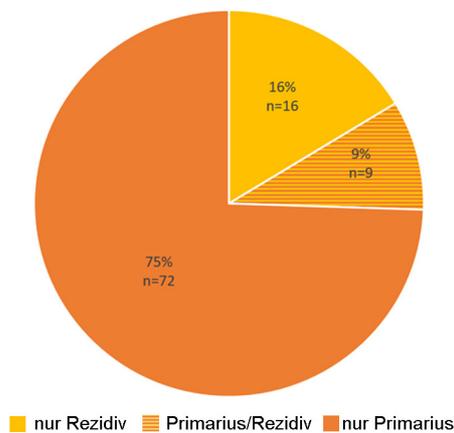


Abbildung 9. Verteilung der Lokalisationen/Entitäten im Patientenkollektiv Zuordnungen zu und Anteile der jeweiligen Untergruppen an den jeweiligen übergeordneten Mengen in Prozent und absoluter Anzahl n (alternative Darstellung der Verteilung von Kopf-Halskarzinomen entsprechend Abb. 8).

4.1.6 Rezidive

Abb. 10 und Tab. 4 zeigen die Verteilung von Primarius- und Rezidivproben im Kollektiv. In 107 Präparaten lagen 25 Rezidive von 25 verschiedenen Patienten vor, davon 16 nur als Rezidiv und 9 gepaart mit den zugehörigen Primarien (s. a. Tab. 11 und 13 im Anhang). 82 Präparate lagen als Primarius-Proben vor, 73 hiervon ohne zugehörige Rezidiv-Probe. Die 9 Rezidiv-Primarius Paare sind in Abb. 10 als schraffierte Fläche aus Überschneidung der Primarius- und Rezidivgruppen dargestellt. In den folgenden Auswertungen der immunhistochemischen Ergebnisse wurden auch im Rezidiv-Primarius Vergleich stets 98 Präparate ausgewertet. Tabelle 4 listet die hierin enthaltenen, durch Stochastik (Losen mittels Excel-Zufallszahl, siehe hierzu auch Kapitel 3.1) ermittelten 9 Präparate aus den Rezidiv-Primarius-Sets detaillierter auf. Tabelle 12 im Anhang zeigt die hierbei nicht eingeschlossenen Fälle. Auf diese Weise wurden schließlich 21 Rezidive in die 98 ausgewerteten Präparate aufgenommen, was einem Verhältnis von 21,4% (Rezidive) zu 78,6% (Primarien) entspricht.



<i>Primarius / Rezidiv</i>	<i>Kategorie</i>	<i>Anzahl Fälle (n)</i>	<i>Anteil an Gesamt (%)</i>
Primarius	Nur Primarius	73	74,5%
	3 (LAR 1) Primarius	1	
	20 (MUH 2) Primarius	1	
	37 (OPH 7) Primarius	1	
	83 (MUH 8) Primarius (R)	1	
Primarius gesamt		77	78,6%
Rezidiv	Nur Rezidiv	16	16,3%
	24 (LAR 13) Rezidiv	1	
	52 (LAR 27) Rezidiv (R)	1	
	65 (NPH 1) Rezidiv	1	
	81 (LAR 41) Rezidiv (R)	1	
	93 (LAR 46) Rezidiv (R)	1	
Rezidiv gesamt		21	21,4%
Gesamt		98	100%

Abbildung 10. Verteilung von Rezidiv und Primarius im Patientenkollektiv. Die schraffierte Fläche bildet die 9 Fälle ab, in denen sowohl Primarius als auch Rezidiv als Probe vorlagen.

Tabelle 4. Verteilung von Primarius und Rezidiv (n=98) (R)=bestätigte Raucher

Insgesamt ist anzumerken, dass die Literatur sich bezüglich der Definitionen eines Rezidivs (lat. *recidere*, „zurückfallen“), Zweittumors oder Residualtumors nicht einig ist. Insbesondere in Bezug auf die zeitliche Dimension besteht hier Uneinigkeit. So besteht die Möglichkeit, dass in einigen Arbeiten vermeintliche Rezidive als Zweitkarzinome definiert werden und umgekehrt, da ein unterschiedliches Intervall zwischen Therapieende und Wiederauftreten des Tumors als Bedingung definiert wird. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn nicht eine unterschiedliche Histologie klar die Abgrenzung zu einem Zweitkarzinom ermöglicht. Die Grenzen erscheinen fließend. Überwiegende Einigkeit besteht bei der Definition eines Rezidivs dahingehend, dass es sich um das „Wiederauftreten einer Krankheit nach klinisch vermuteter Heilung“ [174] handelt. Bezogen auf einen Tumor also um das „Wiederauftreten einer malignen Erkrankung, nachdem diese mindestens einmal eine Remission erreicht hat“, wobei der Begriff Remission gegenüber dem der Heilung doch deutlich mehr Spielraum lässt. Eine spezifischere Definition des Tumorrezidivs berücksichtigt zudem noch die Art der Behandlung, die Entität und die Lokalisation des Tumors: „Wiederauftreten eines histologisch gleichartigen Tumors am gleichen Ort oder im gleichen Organ nach vorausgegangener radikaler Behandlung“ (Pschyrembel-Klinisches Wörterbuch 2017, [174]). Somit ist ein Rezidiv einerseits pathologisch, andererseits klinisch definiert. Die Einbeziehung des gleichen Ortes oder gleichen Organs ist schwierig, da ein Rezidiv auch in Form einer Metastase auftreten kann. Ebenso ist aufgrund der räumlichen

Nähe im Kopf-Hals-Bereich eine scharfe räumliche Trennung insbesondere bei ausgedehnten Tumoren nicht klar zu ziehen. Letztlich entscheidet in Zusammenschau aller Befunde der Kliniker.

In dieser Studie wurde die Beurteilung der behandelnden Fachkollegen aus dem KIS (Krankenhausinformationssystem) übernommen. In der Interpretation wurden Tumore anderer Histologie eindeutig als Zweitkarzinome gewertet, Uneindeutigkeit bestand bei Proben gleicher Histologie und unterschiedlicher Lokalisation. Hier ergab sich ein heterogenes Muster in Bezug auf die räumliche und zeitliche Dimension dahingehend, ob eine Probe als Rezidiv oder Zweitkarzinom gewertet wurde.

4.1.7 Vortherapie mittels Radio-, Chemo- bzw. Radiochemotherapie

12% der HNSCC-Patienten waren vorbehandelt. 100% der behandelten Patienten waren bestrahlt, drei Viertel waren einer Radiochemotherapie (RCT) unterzogen worden. Nicht in allen Fällen, war der Tumor selbst im Rahmen einer (neo-)adjuvanten oder palliativen RCT behandelt worden, in 4 von 12 Fällen waren räumlich benachbarte Tumore (z.B.

Tabelle 5. Verteilung des Merkmals Vortherapie im Patientenkollektiv

vorbehandelt		Anzahl Fälle (n)	Fälle (%)
ja		12	12,2%
	Radiatio	12	12,2%
	Chemotherapie	9	9,2%
	RCT	9	9,2%
nein		86	87,8%
	<i>gesamt</i>	98	100%

Hypopharynx- oder Ösophaguskarzinom) Ziel der Therapie (je 2x Radiatio und RCT) gewesen. In 7 von 12 Fällen war eine gezielte Radiochemotherapie des Tumors selbst erfolgt, in 3 Fällen nur eine Radiatio. 88% der Tumore waren bis zur Gewebeentnahme unbehandelt. Tab. 5 fasst die Ergebnisse der Recherche zusammen.

4.1.8 Kontrollen

Die Kontrollpersonen waren im Vergleich zum HNSCC-Patientenkollektiv deutlich jünger. Alle Kontrollpatient*innen waren bei Gewebeentnahme jünger als 55 Jahre und fielen daher vollständig in die jüngste Alters-Subgruppe. Der Mittelwert lag bei 30 Jahren, der Median bei 27 Jahren. Die Altersverteilung bei Probenentnahme ist in Abb. 11 dargestellt. Die überwiegende Anzahl der Kontrollen waren Gewebeproben normaler Mukosa aus der Tonsillenregion (n=18; 85,7%). Zwei Drittel der Kontrollproben waren männlich, ein Drittel weiblich. Tab. 6 fasst alle 21 Kontrollen mit ihren Eigenschaften zusammen.

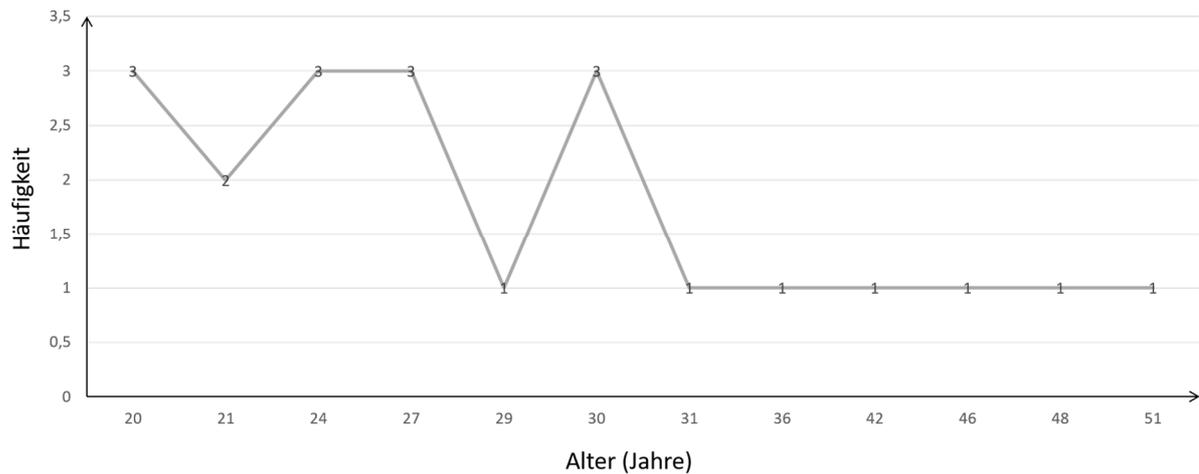


Abbildung 11. Altersverteilung im Kontrollkollektiv

Tabelle 6. Charakteristika der Kontroll-Kohorte – Übersicht

Parameter		Anzahl Fälle (n)	Anteil von Gesamt (%)
Altersverteilung (in Jahren)	<55 Jahre	21	100,0%
	Median	27 J.	
	Mittelwert (+/- STABW)	30 J. (+/-9,3)	
Geschlecht	männlich	14	66,7%
	weiblich	7	33,3%
Lokalisation	Adenoide Vegetationen	2	9,5%
	Pharynxmukosa	1	4,8%
	Tonsille	18	85,7%

Leider spiegelt das Kontroll-Kollektiv unser Patientenkollektiv nicht gut wider: Während in der Kontrollkohorte alle Patienten bei Gewebeentnahme jünger als 55 Jahre alt waren, waren nur 30,6% der untersuchten HNSCC-Patienten bei Erstdiagnose bzw. Gewebeentnahme jünger als 55 Jahre. Ebenso stammen die Kontrollproben zu 100% aus dem Pharynx, davon 85,7% aus dem Oropharynx (Tonsille) und 9,5% (n=2) aus dem Nasopharynx. Bei einer der Proben war vom Operateur keine genauere Lokalisation angegeben worden („Pharynxmukosa“). Dahingegen lag der Anteil der Pharynxkarzinomproben im Patientenkollektiv nur bei etwa 42% der eingeschlossenen HNSCC-Fälle, von denen wiederum 54% (entspricht 22% der 98 Fälle) auf den Oro- und lediglich 2% (entspricht 1% der 98 Fälle) auf den Nasopharynx entfielen.

Für eine bessere Vergleichbarkeit wäre ein Kontrollkollektiv mit ähnlicher Alters- und Geschlechterverteilung sowie insbesondere Gewebeproben gesunder Mukosa aus den verschiedenen anatomischen Lokalisationen (Mundhöhle, Larynx und Pharynx mit den Subgruppen: Oropharynx, Hypopharynx, Nasopharynx) besser geeignet.

Allerdings wird man bei der Gewinnung eines solchen Kontrollkollektivs vor ethische und organisatorische Hürden gestellt. In der klinischen Praxis werden in der Regel nur Gewebeproben bei klinischer Symptomatik und makroskopischer Auffälligkeit entnommen, sodass in seltenen Fällen eine komplett normale Schleimhaut ohne zumindest entzündliche Veränderungen vorliegt. Insbesondere Probenentnahmen aus der Larynxregion bei gesunden Patienten sind in Anbetracht der möglichen Komplikationen als ethisch fragwürdig anzusehen. Probeentnahmen sollten nur bei entsprechendem klinischem Verdacht und gegebener Indikation erfolgen.

4.2 Immunhistochemische Analysen: Kandidatenproteine und Korrelation mit Klinikdaten

Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte durch dieselbe Pathologin (Untersucherin), um eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch persönliche Präferenzen zu minimieren. Das Färbeergebnis setzt sich aus Färbeintensität (SI = staining intensity) und Anteil des positiv-gefärbten Tumors (Prozentpunkte (PP)) zusammen. Beide Faktoren wurden unabhängig voneinander erhoben und anschließend deren Produkt in Form eines Scores gebildet. Ein Score von 0 bedeutet negativ. Ein Score von 1-3 entsprach einer schwachen immunhistochemischen Färbung (geringe Expression); ein mäßiges Färbeergebnis lag bei einem Score von 4 oder 6 vor. Ab einem Score von 8 wurde das Signal als stark gewertet. Ab einem Score von >3 lag eine Überexpression gegenüber der Normalsituation vor (siehe auch Abb. 2).

Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Kontrollkollektiv dargestellt (z.B. Abb. 13, S. 50). Es sind relative Häufigkeiten als Prozent der jeweiligen Grundgesamtheit abgebildet. Auf der x-Achse sind die jeweiligen betrachteten Grundgesamtheiten benannt und die relativen Häufigkeiten (%) der Subgruppen in gruppierten Säulen dargestellt. Die graphische Darstellung divergiert sich in 2 Hälften: Säulendiagramm A und Säulendiagramm B (z.B. Abb. 13, S. 50). A veranschaulicht die positiven (schwarze Säulen) und negativen (weiße Säulen) Färbeergebnisse in den jeweils untersuchten Subgruppen. B differenziert die positiven Färbeergebnisse weiter in schwach, mäßig und stark, wie sie sich aus der Beurteilung anhand des Immunreaktiven Scores (IRS) ergaben. Die jeweiligen absoluten Zahlen sind als n über den Säulen angegeben, Details sind den Tabellen im Anhang und den Bildunterschriften zu entnehmen.

Nicht für jede der 5 immunhistochemischen Färbungen gelang es in allen 98 Fällen ein eindeutig verwertbares Färbeergebnis zu erzielen, sodass auch die Grundgesamtheit je nach Betrachtung und Färbung variiert. Beispielsweise konnten für Ki-67 nur 84 Präparate sinnvoll ausgewertet werden. Die jeweilige Grundgesamtheit ist bei jeder Auswertung angegeben und kann zusätzlich zu weiteren Details aus den zugehörigen Tabellen im Anhang entnommen werden. Im Folgenden werden Auswertungen mit signifikanten oder interessanten Beobachtungen präsentiert.

Alle weiteren Auswertungen sind im graphischen Anhang (Abschnitt 8) aufgeführt.

4.2.1 ABCC2

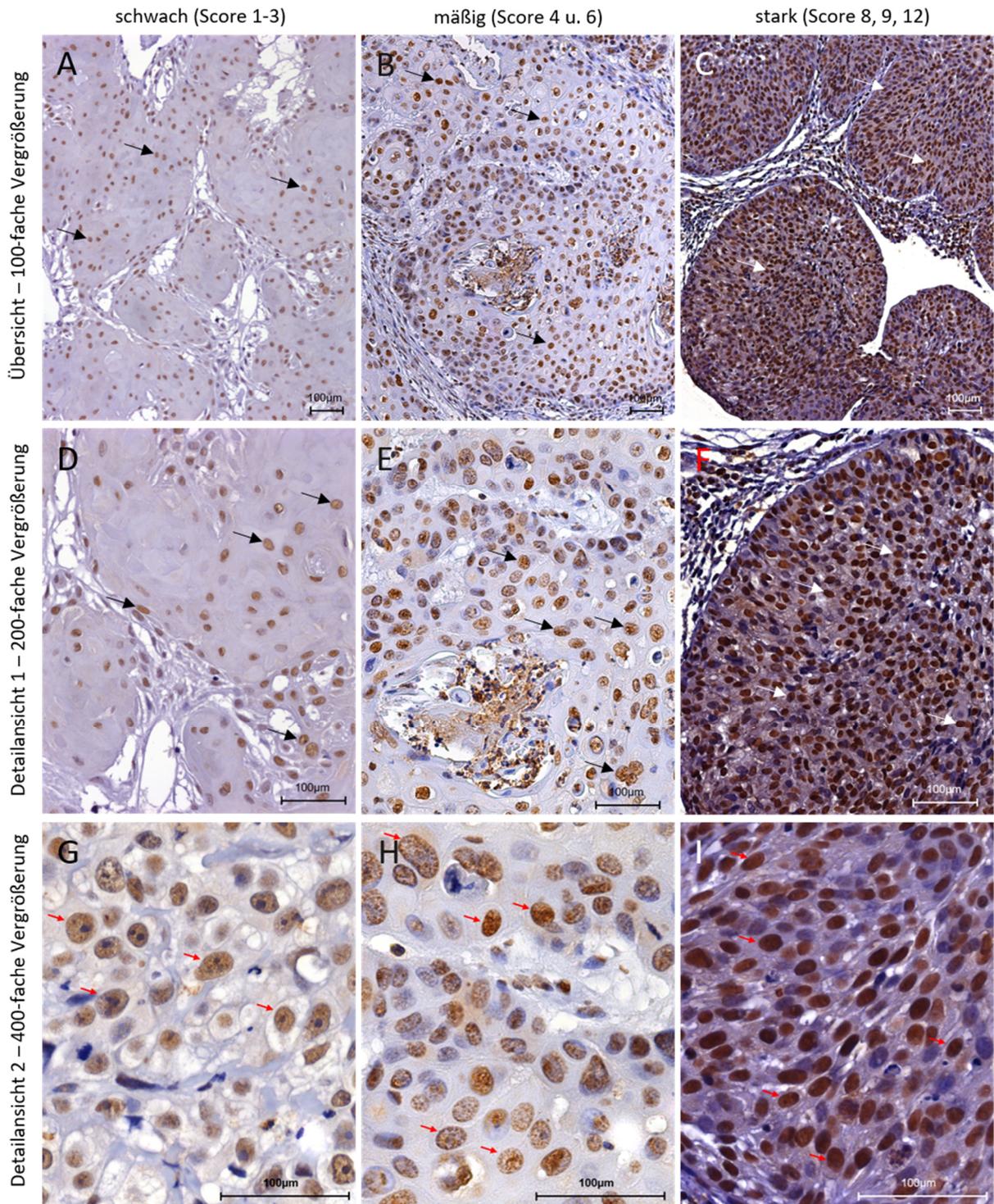


Abbildung 12. Exemplarische Übersichts- und Detail-Darstellungen der immunhistochemischen Ergebnisse für ABCC2 an 3 Beispielen, je nach Färbeargebnis-Score. **A, D, G (schwache Färbung):** A und D: MUH 1, Primarius, 70% (+) n, G: OPH 14, Primarius, 50% (+) - + n; **B, E, H (mäßige Färbung):** LAR 45, Rezidiv, 75% + n; **C, F, I (starke Färbung):** LAR 47, Rezidiv 90% + - + + n. Die **Pfeile** markieren einige der für ABCC2 positiv angefärbten Zellkerne der Tumorzellen. In **G** und **H** erscheint die nukleäre Färbung eher granulär und das Kernkörperchen ist ohne Anreicherung in blauer Gegenfärbung im Nukleus zu erkennen. In **I** hingegen ist die nukleäre Färbung stark, homogen, die Kernkörperchen sind kaum abzugrenzen.

(n = nukleär, LAR = Larynx, MUH = Mundhöhle, OPH = Oropharynx, (+) = schwach positiv, + = einfach positiv, ++ = zweifach positiv)

Abbildung 12 zeigt beispielhaft je 3 Färbeergebnisse für ABCC2: schwache Färbung (Score 1-3), mäßige Färbung (Score 4 u.6) und starke Färbung (Score 8, 9, 12). Ab einem Score von 4 lag eine Überexpression vor. Die Färbung mit ABCC2 führte in nahezu 100% der ABCC2 positiven HNSCC zu einer nukleären Anfärbung. In 94,7% war ABCC2 ausschließlich nukleär nachweisbar, in 3,9% aller ABCC2+ HNSCC (n=3) war zusätzlich eine zytoplasmatische Färbung nachweisbar, in 1,3% eine ausschließlich membranäre Lokalisation (siehe auch Tab. 14 und 15 im Anhang).

4.2.1.1 ABCC2 – Expression positiv/negativ

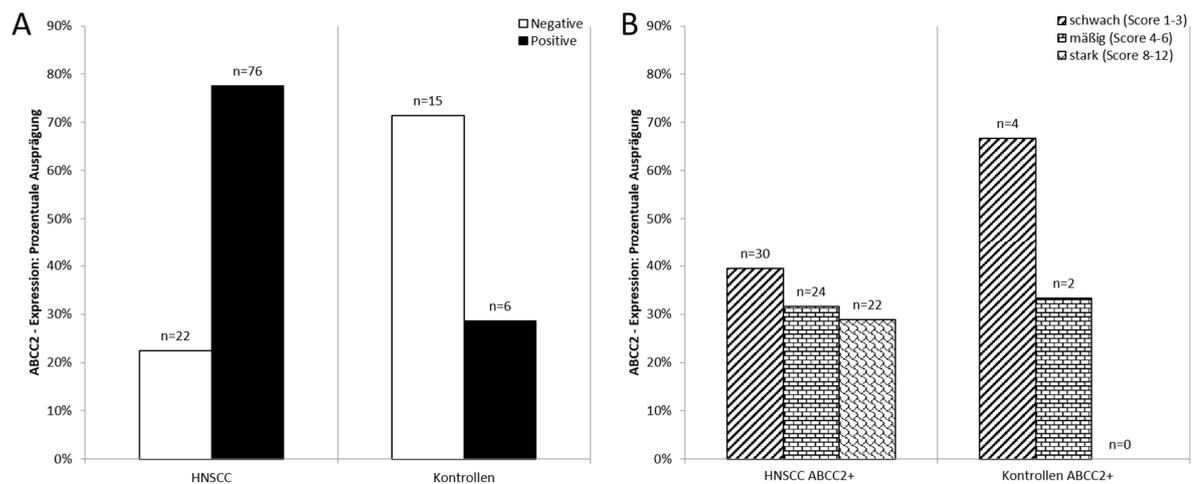


Abbildung 13. ABCC2 Expression – HNSCC vs. Kontrollen

A: Vergleich von HNSCC (n=98) und Kontrollen (n=21) mit positivem und negativem Färbeergebnis für ABCC2. **B:** Differenzierung der ABCC2 positiven Proben der HNSCC und Kontroll-Kohorten in die 3 Scoring-Gruppen: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils ABCC2 positiven HNSCC/Kontrollen.

Bei Anwendung des Chi-Quadrattests (A) bzw. des Exakten Tests nach Fisher bei Einschluss des Scorings (B) ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede in der ABCC2-Expression zwischen HNSCC und Kontrollen unter Berücksichtigung positiver und negativer Proben (A: $p=0,00001$; B: $p=0,0001$)).

Die Expression von ABCC2 wurde in allen 98 HNSCC-Präparaten sowie 21 Kontrollen untersucht (Abb. 13). 78% (n=76) der HNSCC waren positiv für ABCC2, 22% negativ. Für das Kontroll-Kollektiv ergab sich dagegen ein komplett konträres Bild mit 71% (n=15) negativen Proben für ABCC2 und nur 29% positiven. Die ABCC2-Expression unterschied sich in HNSCC und Kontrollen signifikant ($p<0,001$).

Das Scoring der ABCC2 positiven HNSCC Proben zeigte eine gleichermaßen verteilte Gruppengröße von Proben mit einem schwachen, mäßigen und starkem Score (Abb. 13 B), wohingegen bei den ABCC2 positiven Kontrollen 67% eine schwache, 33% eine mäßige und keine Probe (0%) eine starke Färbeintensität aufwiesen. Bei beiden Kontrollen mit mäßiger ABCC2-Expression handelte es sich um Tonsillektomie-Präparate mit Anteilen gesunder Schleimhaut aus dem Bereich des Oropharynx. Auch

unter Berücksichtigung der Ausprägungsverteilung der positiven Ergebnisse (Scoring) ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten ($p < 0,001$, $p = 0,0001$). Betrachtete man nur die positiven Ergebnisse und deren Ausprägungsverteilung unter Ausschluss der negativen Proben ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,272$, Exakter Test nach Fisher), bedingt durch das dann sehr kleine Kontroll-Vergleichskollektiv von nur 6 Proben.

Die Schleimhaut des Pharynx, Larynx und des Mundes sowie der Tonsillenregion zählen bislang nicht zu den typischen Orten der physiologischen ABCC2-Expression [156]. Auch unsere Ergebnisse legen nahe, dass ABCC2 in gesunder Schleimhaut nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert wird, das sich üblicherweise immunhistochemischen Methoden entzieht. Zudem wird berichtet, dass entzündliche Prozesse eher zu einer Herabregulierung der Expression von ABCC2 führen [70, 98, 203]. Es gilt daher zu klären, warum einige der Proben der Kontroll-Kohorte dennoch einen ABCC2 positiven, wenn auch nur schwach positiven Nachweis ergaben. Hierfür sind weitere Untersuchungen an einer größeren Stichprobe bezüglich der ABCC2-Expression in gesunder, entzündeter und dysplastischer Mukosa des HNO-Bereiches erforderlich.

4.2.1.2 **ABCC2 – Expression in HNSCC und Geschlecht der Patienten**

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von ABCC2 in Abhängigkeit vom Geschlecht festgestellt werden. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen exprimierte die überwiegende Anzahl an HNSCC ABCC2 ($m = 79\%$, $w = 71\%$), ein Großteil sogar mäßig bis stark ($m = 48\%$, $w = 43\%$). Auch innerhalb der Kontroll-Kohorte ergab sich hinsichtlich des Geschlechts kein relevanter Unterschied: In beiden Gruppen waren 29% der Proben positiv und 71% negativ für ABCC2, wobei die positiven Proben überwiegend schwache Färbeergebnisse aufwiesen. Bei den männlichen Kontrollen gab es 2 Proben mit mäßiggradigem Färbeergebnis.

Während sich in der männlichen Gruppe HNSCC und Kontrollgewebe bezüglich der ABCC2-Expression signifikant unterschieden ($p = 0,002$, Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher, unter Berücksichtigung aller Proben), konnte für die weiblichen Proben aufgrund der geringen Fallzahlen keine statistisch belastbare Aussage getroffen werden. Abbildung 36 im graphischen Anhang zeigt die zugehörigen Säulendiagramme, Tabelle 14 die zugehörigen absoluten Zahlen.

4.2.1.3 **ABCC2 – Expression in HNSCC und Alter der Patienten**

Im Vergleich der Altersgruppen fiel eine Korrelation von höherem Lebensalter und ABCC2-Expression in HNSCC Geweben auf: Je älter die HNSCC-Patienten in unserem Kollektiv waren, desto größer war der Anteil an ABCC2 positiven Tumoren und desto ausgeprägter war die ABCC2-Expression (häufiger stärkere Expression mit Score >3) (Abb. 37 B im Anhang). In der jungen Kohorte unter 55 Jahren war der Anteil an ABCC2 negativen HNSCC (27%) sowie Proben mit schwacher ABCC2-Expression (40%) relativ höher als bei Patienten über 55 Jahren (18-23% und 20-32%). Besonders deutlich wird der Vergleich mit den Patienten über 65 Jahren, bei denen 57% ein mäßig bis starkes ABCC2 Ergebnis aufwiesen, was 74% (n=17) der ABCC2 positiven HNSCC dieser Altersgruppe entsprach. Allerdings zeigten sich diese Unterschiede nicht als statistisch signifikant.

Die Patienten des Kontrollkollektivs waren alle (100%) jünger als 55 Jahre (n=21) und überwiegend (71%, n=15) ABCC2 negativ. Die Vergleiche von HNSCC der unterschiedlichen Altersgruppen mit der Kontrollkohorte ergaben jeweils einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$), analog zur generell vermehrten ABCC2-Expression in HNSCC gegenüber Kontrollen (Kapitel 4.2.1.1). Ein differenzierter Vergleich mit Kontrollgeweben der zugehörigen Altersgruppen war aufgrund der Demographie des Kontrollkollektivs leider nicht möglich. Abb. 37 im Anhang zeigt die zugehörigen Säulendiagramme, Tab. 14 die zugehörigen absoluten Zahlen.

4.2.1.4 **ABCC2 – Expression in HNSCC und Tumorlokalisation**

Betrachtet man die ABCC2-Expression in HNSCC in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation, zeigt sich über alle Lokalisationen hinweg, dass die Mehrzahl der HNSCC Proben ABCC2 exprimiert, wobei der Großteil eine deutliche Überexpression (Score >3) aufweist. Statistisch signifikante Unterschiede in der ABCC2-Expression in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation ergaben sich nicht, auch wenn die Gruppe der Larynxkarzinome eine häufigere und intensivere ABCC2-Expression gegenüber den HNSCC der Mundhöhle und des Pharynx zeigten (Abb. 38 B im Anhang). 73% der HNSCC_MUH/PHA waren positiv für ABCC2, 37% mit einem Score >3. Die Gruppe der Larynxkarzinome wies mit 83% im Vergleich dazu noch mehr ABCC2 positive Präparate auf und mit insgesamt 57% gegenüber HNSCC_MUH/PHA 20% mehr Präparate mit mind. mäßiggradiger ABCC2-Expression (Score >3). Bezüglich der starken Expression ergab sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen:

22% der HNSCC_MUH/PHA und 23% der HNSCC_LAR wiesen eine starke ABCC2-Färbung auf. Es ist anzunehmen, dass sich in einem größeren Kollektiv die vermeintlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Lokalitäten weiter annähern. Abb. 38 im graphischen Anhang zeigt die zugehörigen Säulendiagramme, Tabelle 14 die zugehörigen absoluten Zahlen.

4.2.1.5 ABCC2 – Expression in HNSCC und Grading

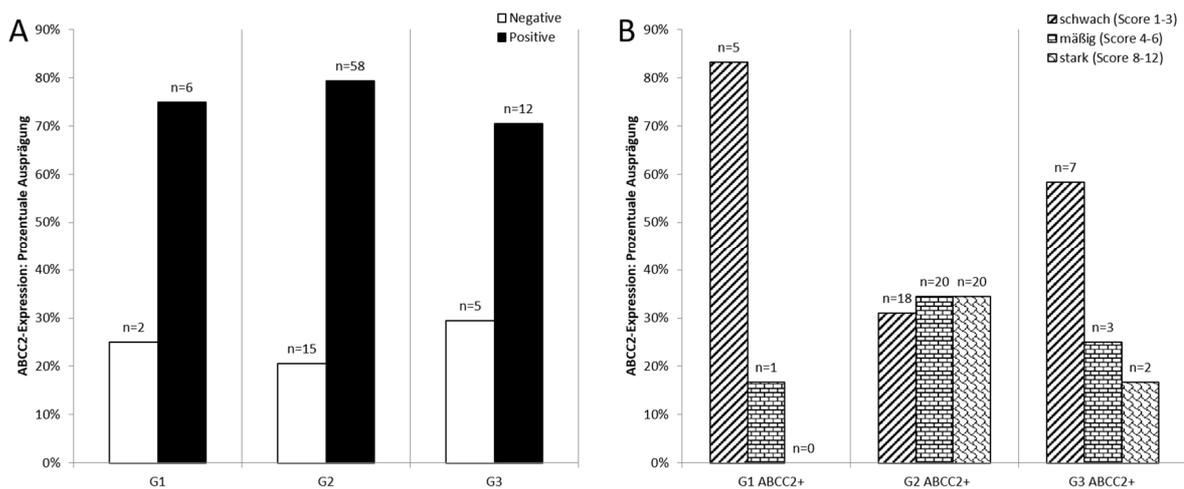


Abbildung 14. ABCC2 Expression – Korrelation mit Differenzierungsgrad G

A: Relative Expression von ABCC2 in HNSCC in Abhängigkeit vom *Grading*. **B:** Differenzierung der ABCC2 positiven Proben abhängig vom jeweiligen Differenzierungsstatus in die 3 Scoring-Gruppen: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils ABCC2 positiven HNSCC. Details zur Graphik siehe Tabelle 14 im Anhang. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der ABCC2-Expression in HNSCC in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Tumors festgestellt werden (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher, A: $p=0,644$; B: $p=0,087$).

Im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv exprimierten die HNSCC-Tumore über alle Differenzierungsgrade hinweg ABCC2 in signifikant höherem Ausmaß. Betrachtete man die ABCC2 Expression in HNSCC in Abhängigkeit vom *Grading* (Abb. 14), schien ab einem mäßigen Differenzierungsgrad des Tumors ($\geq G2$), die ABCC2-Expression zuzunehmen. Unter den G1-Tumoren (HNSCC_G1) wies keiner eine starke Expression auf, überwiegend lag eine schwache Expression vor (Score 1-3: $n=5$, 63%; 83% der G1/ABCC2+ (Abb. 14 B)). Die mäßig differenzierten Tumore (HNSCC_G2) waren zu 79% positiv ($n=58$) für ABCC2, 69% ($n=40$) der positiven Proben zeigten eine mindestens mäßiggradige ABCC2-Expression (Score ≥ 4), 34% sogar ein starkes Färberegebnis (Score ≥ 8 : $n=20$), einschließlich einer Expression in mind. 80% der Tumorzellen. Insgesamt lag in den G2 Tumoren eine gleichmäßige Verteilung über die 3 Färberegebnisse (schwach, mäßig und stark) vor. Bei den wenig differenzierten Tumoren (HNSCC_G3) hingegen schien der relative Anteil an ABCC2-negativen Tumoren (Abb. 14 A, $n=5$, 29%) und Tumoren mit schwacher Expression ($n=7$, 41%; 58% der G3/ABCC2+ (Abb. 14 B)) wieder zuzunehmen, sodass die Tendenz der

Expressionszunahme mit geringerer Differenzierung insbesondere auf den Vergleich von G1 und G2 HNSCC zuzutreffen schien.

Auch wenn die Daten eine Zunahme der ABCC2-Expression mit Zunahme der Entdifferenzierung nahe legen, konnte diesbezüglich keine eindeutige statistische Signifikanz erreicht werden ($p > 0,05$), was zumindest teilweise auch auf die große Diskrepanz in der Subgruppengröße zurückgeführt werden kann. Insbesondere die Gruppe der HNSCC_G1 (n=8 von 98), aber auch die Gruppe der HNSCC_G3 (n=17 von 98) war gegenüber der Anzahl der HNSCC_G2 (n=73 von 98) stark unterrepräsentiert, G4-Tumore waren gar nicht vertreten. Differenzierte man allerdings nach Score >3 (Überexpression = mind. mäßige Expression) vs Score <4 (negative bis schwache Expression) konnten signifikante Unterschiede in der ABCC2-Expression zwischen den Gruppen beobachtet werden ($p=0,022$). Insgesamt exprimierten G2 und G3 HNSCC häufiger ABCC2 in höherem Ausmaß. Gleichzeitig fiel aber auch auf, dass der Anteil der stark (Score ≥ 8) ABCC2 exprimierenden HNSCC in G3 Tumoren unter dem der G2 Tumoren lag und der Anteil an negativen und schwach (Score 1-3) exprimierenden G3 HNSCC vergleichsweise größer als der in G2 HNSCC war, was unserer Hypothese einer Zunahme der ABCC2-Expression in HNSCC mit zunehmender Undifferenziertheit widersprach, sodass sich zusammenfassend keine klare Korrelation zwischen ABCC2-Expression und Differenzierungsgrad in den von uns untersuchten HNSCC-Proben zeigte. Untersuchungen an einer größeren Stichprobe, idealerweise gewonnen im Rahmen einer prospektiven Studie, mit einem ausgeglicheneren Verhältnis von G1, G2 und insbesondere auch G3 und G4 Proben könnten hier Klarheit bringen, ob nicht doch eine Korrelation zwischen Undifferenziertheit und vermehrter ABCC2-Expression bestehen könnte.

4.2.1.6 **ABCC2 – Expression in HNSCC und N-Stadium**

Auch bezüglich der regionären Metastasierung (N0 vs. N+) konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der ABCC2-Expression beobachtet werden (Abb. 39 und ergänzend Tab. 14 im Anhang). Insgesamt ergab sich in beiden Gruppen ein sehr ähnliches Expressionsprofil für ABCC2, wobei in HNSCC_N+ der Anteil an ABCC2 positiven Proben etwas höher lag (N0= 76%, N+= 81%), ebenso wie der Anteil an Tumoren mit mäßiger bis starker Expression (N0= 46%. N+= 49%).

4.2.1.7 ABCC2 – Expression in HNSCC und T-Stadium

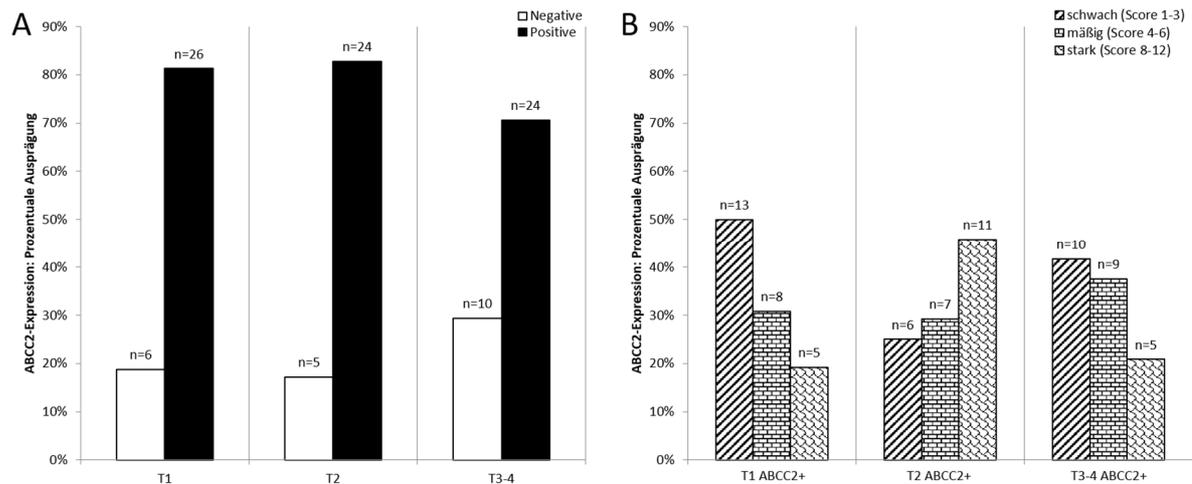


Abbildung 15. ABCC2 Expression – Korrelation mit T-Stadium

A: Verhältnis von ABCC2 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der ABCC2 positiven Proben abhängig vom jeweiligen T-Stadium in die 3 Scoring-Gruppen: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils ABCC2 positiven HNSCC-Probentumoren. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant (Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest, A: $p=0,436$; B: $p=0,187$).

In Abb. 15 ist die ABCC2-Expression in den von uns untersuchten HNSCC nach den T-Stadien aufgeschlüsselt. Es ergab sich ein ähnliches Bild wie schon beim Differenzierungsgrad beobachtet: Mit zunehmendem T-Stadium wird ABCC2 stärker exprimiert. Im T1-Stadium fiel noch eine überwiegend schwache ABCC2-Expression auf. Der Anteil an mindestens mäßiggradiger Expression und schwacher Expression machte bei HNSCC T1 jeweils die Hälfte der positiven Ergebnisse aus (je $n=13$, 41% aller HNSCC T1; bzw. 50% der T1/ABCC2+). Wohingegen Tumore mit starker ABCC2-Expression ($n=5$, 16% aller HNSCC T1; bzw. 19% der T1/ABCC2+) den geringsten Anteil der HNSCC T1 ausmachten. Im T2-Stadium hingegen waren die schwach ABCC2 exprimierenden HNSCC die kleinste Subgruppe ($n=6$, 17% aller HNSCC T2; bzw. 25% der T2/ABCC2+), während 62% (75% der T2/ABCC2+) der Tumore eine mind. mäßiggradige Expression aufwiesen und die stark ABCC2 exprimierenden Tumore mit 38% ($n=11$; 46% der T2/ABCC2+) sogar den größten Anteil der Präparate ausmachten. In der Gruppe der HNSCC T3-4, die zugunsten vergleichbarer Zahlenverhältnisse zusammengefasst wurden, ist ebenfalls eine vermehrte Expression von ABCC2 zu erkennen. Der Anteil der mäßig bis stark exprimierenden Tumore lag bei 41% ($n=14$; 58% T3-4/ABCC2+) gegenüber je 29% mit schwacher (42% der T3-4/ABCC2+) bzw. fehlender Expression (je $n=10$). Ähnlich wie beim Differenzierungsgrad beobachtet, fällt auf, dass trotz überwiegend positiver ABCC2-Expression, der Anteil an negativen Präparaten in der Gruppe der T3-4 Stadien mit 29% von allen T-Stadien am höchsten liegt und auch der Anteil an stark

exprimierenden Tumoren gegenüber dem T2 Stadium eher wieder abgenommen hat. Schlussendlich konnte, auch wenn unsere Daten eine Korrelation von vermehrter ABCC2-Expression und zunehmendem T-Stadium andeuteten, in den von uns untersuchten HNSCC kein statistisch signifikanter Zusammenhang von T-Stadium und ABCC2-Expression festgestellt ($p>0,05$) werden. Tabelle 14 im Anhang zeigt die absoluten Zahlen in tabellarischer Form.

4.2.1.8 ABCC2 – Expression in HNSCC und Expression der übrigen Marker

CK19:

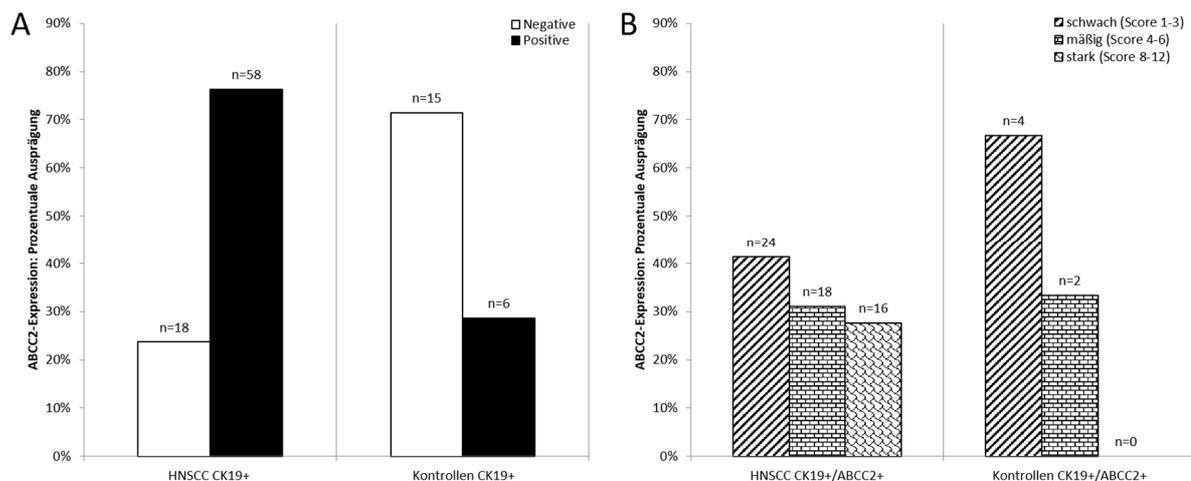


Abbildung 16. ABCC2 Expression in CK19+ HNSCC und CK19+ Kontrollen

A: Verhältnis von ABCC2 positiven und negativen Proben in HNSCC und Kontrollen. **B:** Differenzierung der CK19/ABCC2 doppelt positiven Proben in die 3 Scoring-Gruppen der ABCC2 Färbung: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils ABCC2 und CK19 doppelt positiven HNSCC/Kontrollen.

Die ABCC2-Expression unterschied sich signifikant in den Gruppen der CK19+ HNSCC und der CK19+ Kontrollen (A: $p=0,012$ (Chi-Quadrattest); B: $p<0,001$ (Exakter Test nach Fisher unter Einschluss der negativen Proben)).

Insgesamt waren 76 der 98 HNSCC (78%) positiv für CK19 (Abb. 16A), das allgemein als ein Marker undifferenzierter Zellen gilt und in einer Vielzahl von Tumoren, insbesondere auch nicht-verhornenden Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes exprimiert wird [49]. Nur 22 HNSCC (22%) wiesen keine CK19 Expression auf. Betrachtet man die CK19+ HNSCC exprimierten 76% ($n=58$) ABCC2 (CK19+/ABCC2+ HNSCC). 59% ($n=34$) dieser CK19+/ABCC2+ HNSCC wiesen eine mäßige bis starke Färbung auf, was einer Überexpression entsprach. 28% ($n=16$) zeigten sogar eine starke Expression (Abb. 16 B). Für die Kontroll-Gruppe ergab sich ein gegensätzliches Bild: Zwar waren alle Kontrollen positiv für CK19, allerdings waren 15 dieser 21 CK19+ Kontrollen ohne Nachweis von ABCC2 (71%). Nur 6 CK19+ Kontrollen exprimierten ABCC2 in einem immunhistochemisch nachweisbaren Ausmaß: 2/3 davon schwach, 1/3 mäßig. Keine der CK19 positiven Kontrollen wies ein

starkes ABCC2-Signal auf. Die beobachteten Unterschiede in CK19+ HNSCC und CK19+ Kontrollen zeigten sich statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Ki-67:

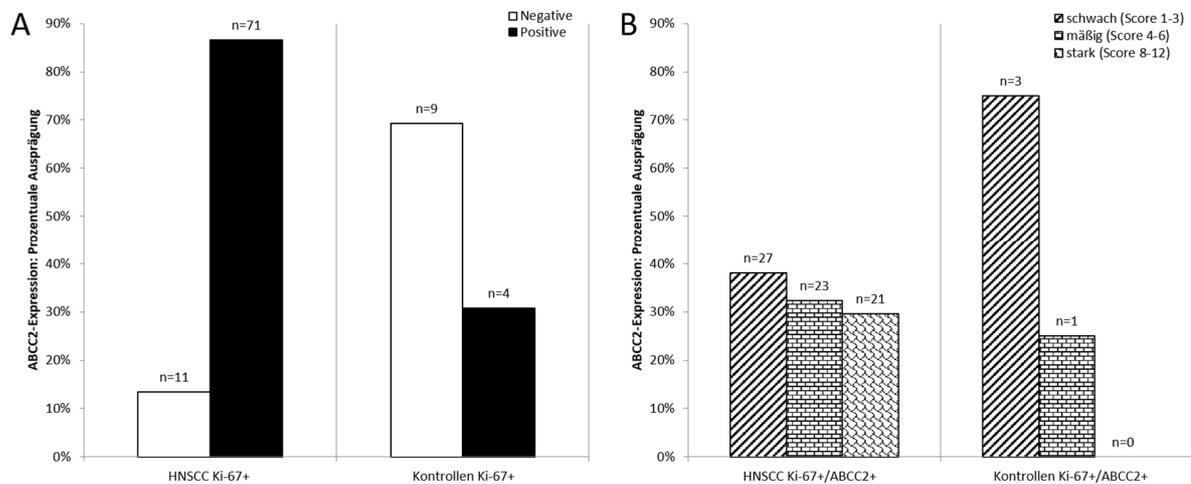


Abbildung 17. ABCC2 Expression in Ki-67+ HNSCC und Ki-67+ Kontrollen

A: Verhältnis von ABCC2 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der Ki-67/ABCC2 doppelt positiven Proben in die 3 Scoring-Gruppen der ABCC2 Färbung: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils ABCC2 und Ki-67 doppelt positiven HNSCC/Kontrollen.

Ki-67+ HNSCC und Ki-67+ Kontrollen unterschieden sich signifikant in ihrer ABCC2-Expression (A und B: $p < 0,001$, Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher unter Einschluss der negativen Proben).

Insgesamt waren 84 von 98 HNSCC-Proben für Ki-67 auswertbar und 14 der 21 Kontrollen. 84% ($n=82$) der HNSCC waren Ki-67 positiv, 2% ($n=2$) negativ. Die zwei Ki-67 negativen Tumore zeigten in 100% ebenfalls keine ABCC2-Expression. Ki-67 positive und negative HNSCC unterschieden sich in ihrer ABCC2-Expression signifikant ($p=0,022$, Exakter Test nach Fisher, nicht abgebildet), wobei angemerkt werden muss, dass sich die Subgruppen sehr stark in ihrer Größe unterschieden (82 HNSCC Ki-67+ vs. 2 HNSCC Ki-67-). Wertete man die Ki-67-Expression erst ab einem Score >3 als positiv, konnte kein signifikanter Unterschied mehr in der ABCC2-Expression zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Tab. 7). Zugunsten der Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse der Ki-67 negativen HNSCC nicht graphisch gezeigt.

Im Vergleich von Ki-67+ Kontrollen und Ki-67+ HNSCC ergab sich ein signifikanter Unterschied in der ABCC2-Expression ($p < 0,001$): 87% ($n=71$) der Ki-67+ HNSCC waren auch positiv für ABCC2 (Ki-67+/ABCC2+ HNSCC; Abb. 17 A). Hiervon zeigten wiederum 62% ($n=44$) eine mindestens mäßige bis starke ABCC2-Expression (Score >3), wobei der Anteil an Tumoren mit mäßiger und starker Expression jeweils etwa die Hälfte ausmachte (Abb. 17 B). Demgegenüber waren die Ki-67+ Kontrollen

überwiegend ABCC2 negativ (n=9, 69%, Abb. 17 A) und die wenigen Ki-67+/ABCC2+ Kontrollen (n=4) exprimierten ABCC2 zu drei Vierteln nur schwach (Abb. 17 B).

Es ist anzumerken, dass die Expression von Ki-67 in der Kontrollgruppe überwiegend (77%, n=10) im Bereich von 1, 2 und 5% (< 10%) lag (Tab. 10 im Anhang, S. 152). Unter Berücksichtigung der in Kap. 4.2.4.1 diskutierten Ergebnisse ist erst ab einem Score ≥ 4 bzw. einer Expression in mehr als 10% der Tumorzellen von einem relevant positiven Ergebnis für Ki-67 auszugehen. Eine Expression in bis zu 10% der Zellen wird als normal angenommen. Es wird zudem erneut auf Tab. 1 verwiesen: Für Ki-67 galten andere Prozentgruppen als für die anderen Färbungen hinsichtlich der Bewertung im Score. Orientiert wurde sich hierbei an der in der Onkologie üblichen Wertung mit prognostischer Bedeutung von Ki-67 ab einer Expression in mehr als 11% der Tumorzellen, z.B. bei gynäkologischen Tumoren, insbesondere der Mammae. In der Literatur werden verschiedene *Cut-off* Werte für Ki-67 verwendet um die Kollektive in prognostisch-bedeutsam und prognostisch-nicht-bedeutsam zu dichotomisieren. Überwiegend werden jedoch *Cut-off* Werte zwischen 10-20% angelegt, am häufigsten wird > 10% verwendet [218]. Ab einer Ki-67-Expression in > 10% des Tumors ist also von einer erhöhten Proliferationsneigung mit klinisch prognostischer Bedeutung auszugehen.

Dichotomisiert man das Ki-67-Färbe-Ergebnis in den von uns untersuchten HNSCC entsprechend dieses *Cut-off* Wertes ergibt sich das in Tab. 7 dargestellte Verhältnis ohne Hinweis auf einen statistisch signifikanten Unterschied in der Expression von ABCC2 in Ki-67 positiven (Score >3) oder Ki-67 negativen HNSCC (Score 0-3). Dies lässt vermuten, dass der zuvor beobachtete signifikante Unterschied von Ki-67 positiven HNSCC und Ki-67 negativen HNSCC in Bezug auf ihre ABCC2-Expression aufgrund der geringen Fallzahl an Ki-67 negativen HNSCC wenig Aussagekraft hat und die Verteilung der lediglich zwei Ki-67 negativen HNSCC möglicherweise eher dem Zufall entspringt als einer klaren Korrelation oder gar Kausalität.

Tabelle 7. ABCC2 Expression in HNSCC mit Ki-67 Score >3 vs. Score 0-3

ABCC2	Ki-67 Score >3	Ki-67 Score ≤ 3	gesamt
Färbung +	44	27	71
Färbung -	5	8	13
gesamt	49	35	84

Die Kreuztabelle zeigt das Verhältnis der ABCC2 positiven und negativen HNSCC unter Berücksichtigung des Grenzwerts für ein positives Ergebnis von Ki-67 ab einem Score >3. Unter diesen Bedingungen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der ABCC2-Expression bei Ki-67 „+“ und Ki-67 „-“ HNSCC ($p=0,114$, Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest).

Es bleibt daher zu schlussfolgern, dass sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Ki-67 und ABCC2-Expression in HNSCC ergab.

Auch wenn sich die ABCC2-Expression zwischen Ki-67+ HNSCC und Ki-67+ Kontrollen signifikant ($p < 0,001$) unterschied, was am ehesten ein Abbild des Vergleichs von HNSCC und Kontrollen als solche ist, und auch, wenn sich ein vermeintlich statistischer Unterschied zwischen Ki-67+ und Ki-67- HNSCC bezüglich der ABCC2-Expression ergab ($p = 0,022$), bleibt anzumerken, dass sich die Subgruppen sehr stark in ihrer Größe unterschieden, was die statistische Aussagekraft schmälert. Wertete man die Ki-67-Expression erst ab einem Score > 3 als positiv, konnten bezüglich der Expression von ABCC2 keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen HNSCC mit und ohne Ki-67-Expression festgestellt werden (Tab. 7).

p53:

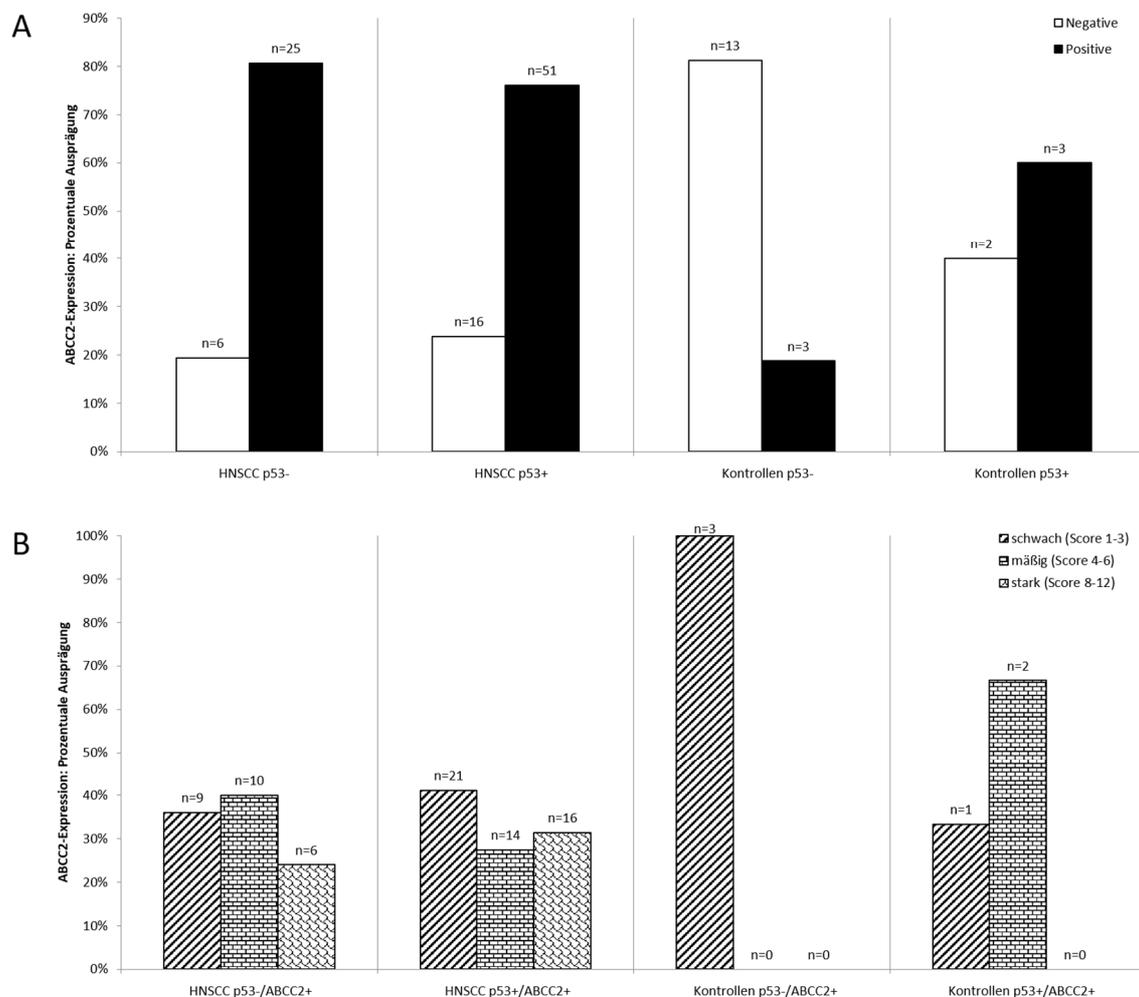


Abbildung 18. ABCC2 Expression in HNSCC und Kontrollen unter Berücksichtigung des p53-Status **A:** Verhältnis von ABCC2 positiven und negativen Proben in p53 negativen und p53 positiven HNSCC und Kontrollen. **B:** Differenzierung der positiven Färbegergebnisse für ABCC2 in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils ABCC2 positiven p53+/- HNSCC und Kontrollen. Siehe auch Tabelle 14 im Anhang.

Sowohl bei den p53 positiven HNSCC (p53+ HNSCC, n= 67, 68% aller HNSCC) als auch den p53 negativen Tumoren (p53- HNSCC, n=31, 32% aller HNSCC) konnte eine vermehrte Expression von ABCC2 festgestellt werden (Abb. 18 A). Insbesondere die p53-/ABCC2+ HNSCC wiesen in 64% (n=16) eine mindestens mäßige bis starke ABCC2-Expression (Score >3) auf. Auf die p53+/ABCC2+ HNSCC traf dies nur in 59% (n=30) der Fälle zu (Abb. 18 B). p53+ HNSCC waren gegenüber den für p53 negativen HNSCC häufiger ABCC2 negativ (Abb. 18 A, 24%, n=16 vs 19%, n=6). Insgesamt konnte aber zwischen p53- und p53+ HNSCC kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der ABCC2-Expression festgestellt werden ($p=0,618$, Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest), sodass anhand unserer Daten kein eindeutiger Zusammenhang von ABCC2-Expressionsstärke und p53-Status in HNSCC nachzuweisen war.

Verglich man die jeweiligen HNSCC-Subgruppen mit ihren zugehörigen p53 positiven bzw. negativen Kontroll-Vergleichsgruppen wurde für die ABCC2-Expression in p53+ HNSCC und Kontrollen kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden ($p=0,593$, Exakter Test nach Fisher), wohingegen sich p53 negative HNSCC und Kontrollen in signifikantem Ausmaß in ihrer ABCC2-Expression unterschieden ($p<0,001$; Chi-Quadratstest). Hierbei muss angemerkt werden, dass die Gruppe der p53+ Kontrollen mit nur 5 Fällen, auch insbesondere gegenüber der Vergleichsgruppe mit n=67 p53 positiven HNSCC, sehr klein war, was die Aussagekraft des Vergleichs stark einschränkt. Dass sich Kontrollen und HNSCC in ihrer ABCC2-Expression signifikant unterscheiden wurde bereits in Kapitel 4.2.1.1 gezeigt, ein spezieller Unterschied in der ABCC2-Expression bezogen auf den p53-Status zwischen diesen Subgruppen ergab sich nicht.

Die überwiegende Anzahl der Kontrollen war p53 negativ (n=16 von 21), wie in normalen Geweben zu erwarten. Die vermeintliche höhere und häufigere Expression von ABCC2 in p53 positiven Kontrollen gegenüber p53 negativen Kontrollen ist, unter anderem bedingt durch die geringen Fallzahlen, nicht als überzufällig einzustufen: Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der ABCC2-Expression zwischen den p53 negativen und positiven Kontrollen ($p=1,0$).

Abschließend konnte keine Korrelation und insbesondere auch kein signifikanter Zusammenhang zwischen p53-Status und ABCC2-Expression in HNSCC und Kontrollen gefunden werden.

ABCC2-Expression in CK19+, Ki-67+/- und p53+/- HNSCC und Kontrollen - Fazit

Abschließend ergaben die Co-Färbungen von HNSCC und Kontrollen die folgenden Beziehungen: Es konnte kein eindeutig signifikanter Zusammenhang zwischen ABCC2-Expression und p53-Expression in HNSCC und Kontrollen festgestellt werden. Hingegen zeigte sich für CK19 und ABCC2 eine eindeutig zunehmende ABCC2-Expression in CK19+ HNSCC gegenüber der Kontrollgruppe. Zwar waren alle Kontrollen CK19+, exprimierten dies aber nur in geringem Ausmaß. Zwischen CK19- und CK19+ HNSCC waren keine relevanten Unterschiede in der ABCC2-Expression zu beobachten.

Für Ki-67 wurde zwar ein signifikanter Unterschied zwischen der ABCC2-Expression in Ki-67+ HNSCC im Vergleich mit Ki-67+ Kontrollen festgestellt und auch Ki-67+ HNSCC und Ki-67- HNSCC unterschieden sich bezüglich der ABCC2-Expression signifikant ($p=0,022$). Allerdings unterschieden sich die Subgruppen sehr stark in ihrer Größe voneinander, so dass die Aussagekraft dieses Ergebnisses fraglich bleibt. Insbesondere unter Berücksichtigung der für Ki-67 relevanten *Cut-off* Werte für ein positives Ergebnis ab einem Score >3 (s. auch Kapitel 4.2.4.1) war zwischen Ki-67+ und Ki-67- HNSCC kein signifikanter Zusammenhang mehr nachweisbar (Tab. 7).

4.2.2 ABCG2

Die Färbung mit ABCG2 führte zu einer überwiegend zytoplasmatischen Anfärbung: ABCG2 war in 100% der ABCG2+ HNSCC im Zytoplasma zu finden, in 88% lag eine alleinige zytoplasmatische Anfärbung vor. In 9,6% aller ABCG2+ HNSCC war zusätzlich eine nukleäre Färbung nachweisbar, in 2,4% zusätzlich eine membranäre Anreicherung (siehe auch Tab. 16 und 17 im Anhang). Abb. 19 zeigt beispielhaft je 3 Färbeergebnisse für ABCG2: schwache Färbung (Score 1-3), mäßige Färbung (Score 4 u. 6) und starke Färbung (Score 8, 9, 12). Ab einem Score von 4 lag eine Überexpression vor.

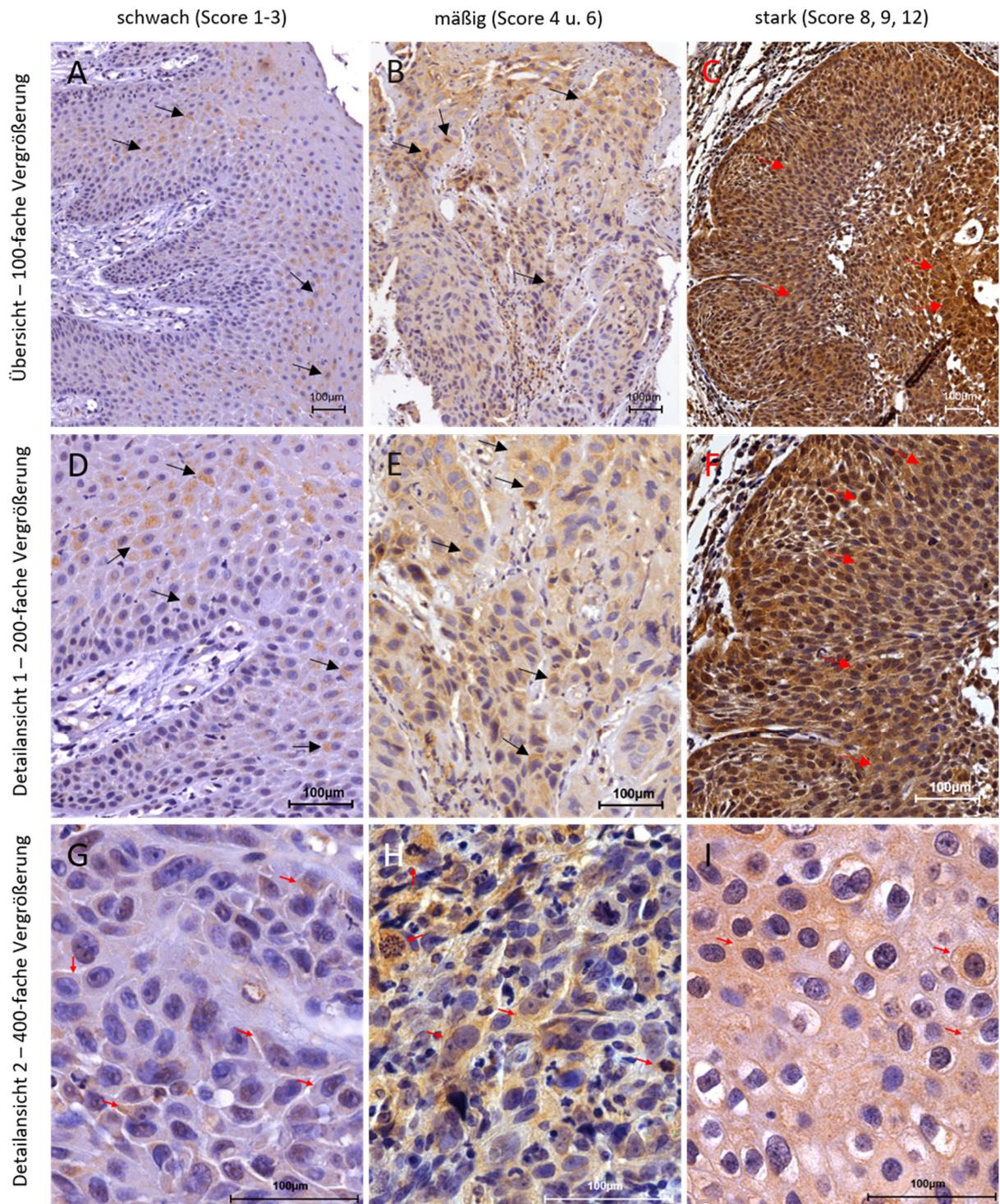


Abbildung 19. Exemplarische Übersichts- und Detail-Darstellungen der immunhistochemischen Ergebnisse für ABCG2 an 3 Beispielen, je nach Färbeergebnis-Score. **A, D:** MUH 2, Primarius, 20% (+) cp; **B, E:** OPH 20, Rezidiv, 50% + cp; **C, F:** LAR 47, Rezidiv 90% ++ cp. **G:** LAR 1, Primarius, 5% + cp; **H:** OPH 8, Primarius, 50% +-+++ cp; **I:** LAR 45, Rezidiv, 80% + - ++ cp. Die Pfeile zeigen exemplarisch auf das für ABCG2 positiv angefärbte Zytoplasma einiger Tumorzellen. (cp = zytoplasmatisch, LAR = Larynx, MUH = Mundhöhle, OPH = Oropharynx, (+) = schwach positiv, + = einfach positiv, ++ = zweifach positiv)

4.2.2.1 ABCG2 – Expression positiv/negativ

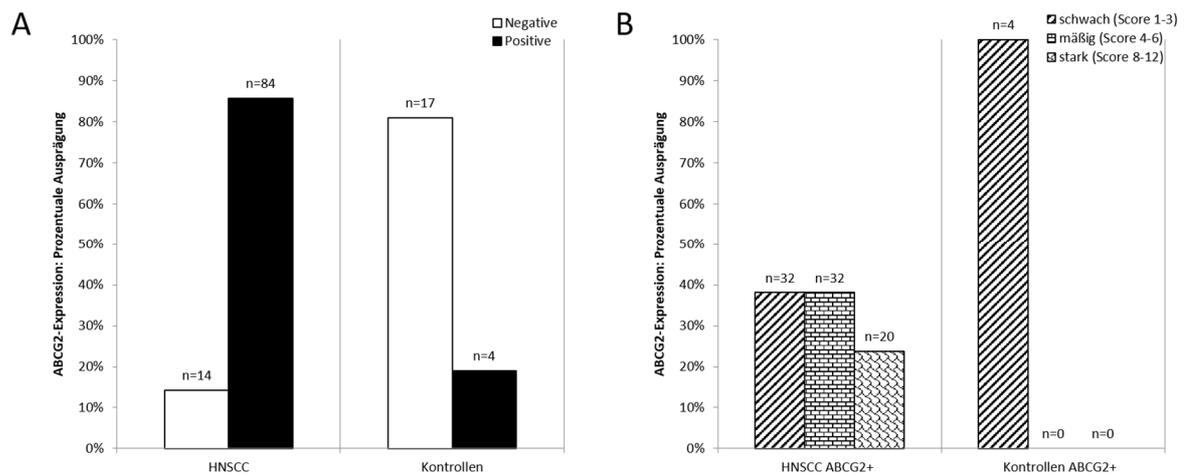


Abbildung 20. ABCG2 Expression – HNSCC vs. Kontrollen

A: Verhältnis von ABCG2 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der ABCG2 positiven Proben in die 3 Scoring-Gruppen: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils ABCG2 positiven HNSCC/Kontrollen.

Die beobachteten Unterschiede in der ABCG2-Expression zwischen HNSCC und Kontrollen sind statistisch signifikant (A und B: $p < 0,001$, Kontingenztabelleanalyse, Chi-Quadratstest unter Berücksichtigung der negativen Ergebnisse). Details sind Tabelle 16 im Anhang zu entnehmen.

Betrachtet man die ABCG2-Expression in Kontrollen und allen 98 HNSCC-Patient*innen (Abb. 20) fällt auf, dass 86% ($n=84$) der HNSCC positiv für ABCG2 waren und ihr Großteil ABCG2 mindestens mäßig bis stark exprimierte ($n=52$, 53% aller HNSCC, 62% der ABCG2+ HNSCC). Nur 14% ($n=14$) der HNSCC waren negativ für ABCG2. Wohingegen die Kontrollen normaler Mukosa sich in 81% der Fälle ($n=17$) negativ für ABCG2 zeigten. Die wenigen ABCG2+ Kontrollen ($n=4$, 19%) wiesen zu 100% ein schwaches Ergebnis auf bzw. 0% der Kontrollen boten eine mäßige bis starke Expression von ABCG2. Die ABCG2-Expression unterschied sich in HNSCC und Kontrollen signifikant ($p < 0,001$).

Betrachtet man nur die positiven Ergebnisse untereinander, ergibt sich ein knapp nicht signifikanter Unterschied, u.a. aufgrund der geringen Stichprobengröße der Kontrollen (B: $p=0,076$, Exakter Test nach Fisher), schließt man die negativen Proben bei der Vergleichsanalyse mit ein, ergibt sich wieder der zuvor beobachtete statistisch signifikante Unterschied ($p < 0,001$, Chi-Quadratstest).

4.2.2.2 ABCG2 – Expression in HNSCC und Geschlecht

Trennt man Kontrollen und HNSCC nach den Geschlechtern auf und untersucht diese auf deren ABCG2-Expression (Abb. 40 im graphischen Anhang), ergibt sich ein sehr ähnliches Bild wie für ABCC2: Die HNSCC, ob männlich oder weiblich exprimierten vermehrt ABCG2 (85% und 93%), während die Kontrollen überwiegend ABCG2

negativ waren (71% und 100%). Diese Unterschiede zwischen HNSCC und Kontrollen zwischen den Geschlechtersubgruppen zeigten sich statistisch signifikant ($p < 0,001$, Exakter Test nach Fisher). Frauen waren sowohl in HNSCC als auch Kontrollen weniger vertreten ($n = 14/98$ vs. $n = 7/21$) als Männer ($n = 84/98$ vs. $n = 14/21$). Bei den weiblichen HNSCC schien, anders als bei den männlichen, eine schwache Expression von ABCG2 ($n = 7$, 50%) relativ gesehen häufiger als eine mäßige oder starke (je $n = 3$, 21,4%). Aufgrund der sehr unterschiedlich großen Geschlechtersubgruppen in unserer Stichprobe mag aber auch die reduzierte Anzahl an weiblichen Proben hier einen Unterschied vortäuschen, da bei den Frauen die einzelnen Proben schwerer ins Gewicht fallen.

Abschließend ließen sich bezüglich des Patienten-Geschlechts keine statistisch signifikanten Unterschiede in der ABCG2-Expression in HNSCC feststellen.

4.2.2.3 **ABCG2 – Expression in HNSCC und Alter**

Betrachtet man die Altersverteilung in den beiden Vergleichsgruppen (HNSCC und Kontrollen, Abb. 41 im Anhang), so fällt auf, dass HNSCC in allen Altersgruppen ABCG2 häufiger und auch stärker als die Kontrollkohorte exprimierten. Diese Unterschiede zwischen HNSCC und Kontrollkohorte waren, analog zu den Beobachtungen in Kapitel 4.2.2.1, statistisch signifikant ($p < 0,001$, Chi-Quadratstest). Allerdings waren, wie in Kapitel 4.1.8 beschrieben, 100% der Kontrollen der jüngsten Altersgruppe zuzuordnen, so dass ein differenzierterer Vergleich nicht möglich war.

Vergleicht man die Expression von ABCG2 in HNSCC in den 3 Altersgruppen untereinander, so fällt auf, dass bei den HNSCC-Patienten über 65 Jahren nahezu 100% ABCG2 positiv waren ($n = 29$, 97%). Bezieht man die semiquantitativen Ergebnisse mit in die Betrachtung ein, exprimierten zwei Drittel der HNSCC > 65 J. ABCG2 mindestens mäßig bis stark (67%, $n = 20$). Somit lässt sich auch bei ABCG2 die in Abschnitt 4.2.1.3 für ABCC2 gemachte Beobachtung wiederholen: Je älter die HNSCC-Patienten sind, desto größer ist der Anteil an ABCG2 positiven HNSCC und auch der relative Anteil an Tumoren mit mindestens mäßiger bis starker Expression. Die Gruppe der über 65-jährigen Patienten wies hierzu passend mit 33% den, gegenüber den anderen Altersgruppen relativ gesehen, größten Anteil an stark exprimierenden HNSCC auf. Die beobachteten Unterschiede zeigten sich allerdings nicht statistisch signifikant ($p = 0,124$, Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher). Auch ein, aufgrund der auffälligen Ergebnisse in der höchsten Altersgruppe gezogener, dichotomer Vergleich von Patienten ≤ 65 J. und > 65 J. ergab einen knapp nicht signifikanten Unterschied ($p = 0,058$, Exakter Test nach Fisher).

Die Patienten des Kontrollkollektivs waren zu 100% jünger als 55 Jahre (n=21) und überwiegend (n=17, 81%) ABCG2 negativ.

Als Fazit bleibt, dass bezüglich des Patienten-Alters bei Erstdiagnose keine statistisch signifikanten Unterschiede in der ABCG2-Expression in HNSCC festgestellt werden konnten. Auch wenn sich Hinweise ergaben, dass die ABCG2-Expression mit höherem Alter bei Erstdiagnose zunimmt. Leider umfasste das Kontrollkollektiv nur Patienten jünger als 55 Jahre, sodass keine Daten über eine ABCG2-Expression in gesunder Mukosa höheren Lebensalters vorlagen. Daher kann anhand der hier untersuchten Gewebeproben keine Aussage zu einer physiologisch erhöhten Expression von ABCG2 in Mukosa des oberen Aerodigestivtraktes im höheren Alter getroffen werden.

4.2.2.4 **ABCG2 – Expression in HNSCC und Tumorlokalisation**

In Abbildung 42 im graphischen Anhang ist die relative ABCG2-Expression in HNSCC und Kontrollen in Abhängigkeit zur Lokalisation dargestellt. Die Kontrollen stammen zu 100% aus dem Oropharynx, überwiegend aus der Tonsillenregion, wodurch für sie nur eine Lokalisation abgebildet ist. Die Larynxkarzinome stellten die größte Subgruppe in unserer HNSCC-Stichprobe dar, sodass diese Daten die höchste Aussagekraft besitzen. Aufgrund der Zahlen wurden die HNSCC der Mundhöhle und des Pharynx wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben zusammengefasst.

Einzel betrachtet ergab sich für die Tumoren aus dem Bereich der Mundhöhle (HNSCC_MUH) und des Pharynx (HNSCC_PHA) ein ähnliches Bild: Im Bereich der Mundhöhle waren 80% (n=8) der HNSCC ABCG2 positiv, bei den Pharynxkarzinomen 83% (n=34). Die HNSCC der Mundhöhle boten ein ausgewogenes Verteilungsmuster von schwacher Expression und mind. mäßiggradiger Expression (je 40%, n=4; 20% mit starker Expression, n=2), bei den Pharynxkarzinomen zeigten 51% eine mäßige bis starke Färbung für ABCG2, mit allerdings geringerem Anteil an stark-ABCG2 exprimierenden Tumoren (n= 4, 10%).

Kumuliert war die Gruppe der HNSCC_MUH/PHA in 82% der Fälle ABCG2 positiv, in 49% der Fälle mindestens in mäßigem Ausmaß. Bei den Larynxkarzinomen (HNSCC_LAR) waren 89% (n=42) der HNSCC ABCG2 positiv und nahezu 60% (n=27, 57%) wiesen eine mindestens mäßiggradige Expression auf. Somit lag in den von uns untersuchten HNSCC des Larynx gegenüber denen des Pharynx und der Mundhöhle häufiger eine positive Färbung für ABCG2 vor. Zusätzlich schienen HNSCC_LAR häufiger eine stärkere Expression von ABCG2 aufzuweisen (60% vs. 49%). Insbesondere der Anteil an ABCG2 stark-exprimierenden HNSCC (Score 8-12) war

bei den Tumoren des Larynx mit 30% (n=14/47) doppelt so hoch wie der Anteil bei HNSCC_MUH/PHA mit nur 12% (n=6/51).

Betrachtet man die relative ABCG2-Expression je nach HNSCC-Lokalisation, so ergibt sich das bereits in den anderen Betrachtungen festgestellte Bild: Die Mehrzahl der HNSCC zeigte eine ABCG2-Expression, wobei der Großteil eine deutliche Überexpression, mindestens mäßige bis starke Expression aufwies. Diese gegenüber den Kontrollen beobachteten Unterschiede sind statistisch signifikant ($p > 0,001$). Betrachtet man die Expressionsstärke für ABCG2 in den einzelnen Lokalisationen differenzierter, so fällt in den von uns untersuchten HNSCC ein höherer Anfall an starker ABCG2-Expression in HNSCC_LAR gegenüber der Vergleichsgruppe auf, allerdings zeigte sich diese Beobachtung nicht als statistisch belastbar. Auch wenn sich das Ergebnis für die starke Expression zwischen den beiden Gruppen signifikant zu unterscheiden schien ($p < 0,05$), musste bei Betrachtung der Verteilung der Scoreergebnisse berücksichtigt werden, dass sich die ABCG2-Expression in HNSCC_MUH/PHA und HNSCC_LAR nicht eindeutig signifikant unterschied und die beobachteten Unterschiede in der starken Expression lediglich stochastische Effekte darstellen können. Andererseits ist es auch möglich, dass sich bei einer größeren Stichprobe der beobachtete Unterschied als eindeutig signifikant herausstellt.

Abschließend lässt sich festhalten, dass zwischen ABCG2-Expression und Herkunft (Lokalisation) der HNSCC keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren. Bezüglich der Lokalisation gab es Tendenzen zu einer vermehrten und stärker ausgeprägten Expression von ABCG2 in HNSCC des Larynx gegenüber HNSCC mit Lokalisation in Mundhöhle oder Pharynx, allerdings zeigten sich diese Daten nicht statistisch belastbar.

4.2.2.5 **ABCG2 – Expression in HNSCC und Grading**

Betrachtete man die ABCG2-Expression in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad so fiel auf, dass sich über alle *Grading*-Stufen hinweg eine Überexpression von ca. 50% (G1= 50%, G2= 55%, G3= 47%) zeigte (Abbildung 43 im Anhang).

Die untersuchten HNSCC jeder Subgruppe waren überwiegend ABCG2 positiv und der größte Anteil der G1, G2 und G3 HNSCC exprimierte ABCG2 mindestens mäßig bis stark. Relativ zeigte sich der größte Anteil einer Überexpression bei den G2-Tumoren, mit dem größten Anteil von stark exprimierenden HNSCC (n=18, 25%). Eine starke ABCG2-Expression wurde nur bei G2-3 HNSCC gemessen. Weder G1-Tumore noch die Kontrollen zeigten ein starkes Färbeergebnis.

Die Daten legen nahe, dass die ABCG2-Expression nicht in einem klaren Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors steht. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen G1-, G2- und G3-Stadium und der Expression von ABCG2 ($p > 0,05$). Allerdings muss angemerkt werden, dass sowohl die Gruppe der G1-, als auch die Gruppe der G3-Tumoren stark unterpowered waren (G1: $n=8$, G3: $n=17$ vs. G2: $n=73$). Allein durch die sehr unterschiedliche Gruppengröße sind signifikante Beobachtungen unwahrscheinlich, hierfür müssten sehr starke Effekte vorliegen und selbst dann könnten diese aufgrund stochastischer Einflüsse verschleiert werden.

4.2.2.6 **ABCG2 – Expression in HNSCC und N-Stadium**

Betrachtet man die Expression von ABCG2 in HNSCC in Abhängigkeit des N-Status, so ergibt sich ein ähnliches Bild mit überwiegend positivem Nachweis von ABCG2 in beiden Gruppen (N0 HNSCC: 80%, N+ HNSCC: 88%). Interessant ist die Betrachtung nach Lymphknotenstatus unter Berücksichtigung der Signalintensität: Gegenüber den N0 HNSCC wiesen die HNSCC mit Lymphknotenmetastasen (N+ HNSCC) eine deutlich vermehrte ABCG2-Expression auf: 63% der N+ HNSCC exprimierten ABCG2 mäßig bis stark, gegenüber 41% bei den N0 HNSCC, bei denen die schwache Expression mit 39% den größten Anteil ausmachte. Die starke Expression lag bei N+ HNSCC mit 26% ($n=11$) doppelt so hoch wie in N0 HNSCC (11%, $n=5$) (Abb. 44 B im Anhang). Dennoch zeigte sich auch dieser beobachtete Unterschied nicht als statistisch signifikant. Yanamoto et al. hingegen konnten in OSCC eine signifikant erhöhte Expression von ABCG2 bei Vorliegen einer regionalen Lymphknotenmetastasierung feststellen [254].

4.2.2.7 **ABCG2 – Expression in HNSCC und T-Stadium**

Auch die Betrachtung in Abhängigkeit zum T-Stadium ergab interessante Auffälligkeiten, jedoch ohne eindeutige statistische Signifikanz (Abbildung 45 im graphischen Anhang): ABCG2 wurde mit zunehmendem T-Stadium vermehrt exprimiert. Mit Zunahme des T-Stadiums erhöhte sich der Anteil der ABCG2 positiven HNSCC (T1 ($n=26$) 81%, T2 ($n=24$) 83%, T3-4 ($n=31$) 91%) sowie auch der Anteil der HNSCC mit mind. mäßiggradiger bis starker Expression (T1 ($n=11$) 34%, T2 ($n=18$), T3-4 ($n=21$) je 62%). Auch der Anteil starker Expression nahm zu. Der relativ größte Anteil einer starken ABCG2-Expression lag bei den HNSCC im T3-4-Stadium vor ($n=8$, 24%). Wobei der relativ gesehen geringste Anteil an schwacher ABCG2-Expression bei gleichzeitig überwiegend starker ABCG2-Expression in den T2-HNSCC vorlag

(n=6, 21%). In den T1-HNSCC exprimierte der Großteil von 47% ABCG2 schwach positiv. Die beobachteten Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Erst eine Zusammenfassung zu größeren Fallzahlen durch Dichotomisierung nach T1 vs. >T1 konnte signifikante Unterschiede aufdecken. Auch wenn die Daten einen Zusammenhang von vermehrter ABCG2-Expression und höherem T-Stadium nahelegen, konnte kein eindeutiger statistischer Zusammenhang gefunden werden. Um einen möglichen eindeutigen statistischen Zusammenhang nachweisen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen an größeren Fallzahlen.

4.2.2.8 ABCG2 – Expression in HNSCC und Expression der übrigen Marker

CK19:

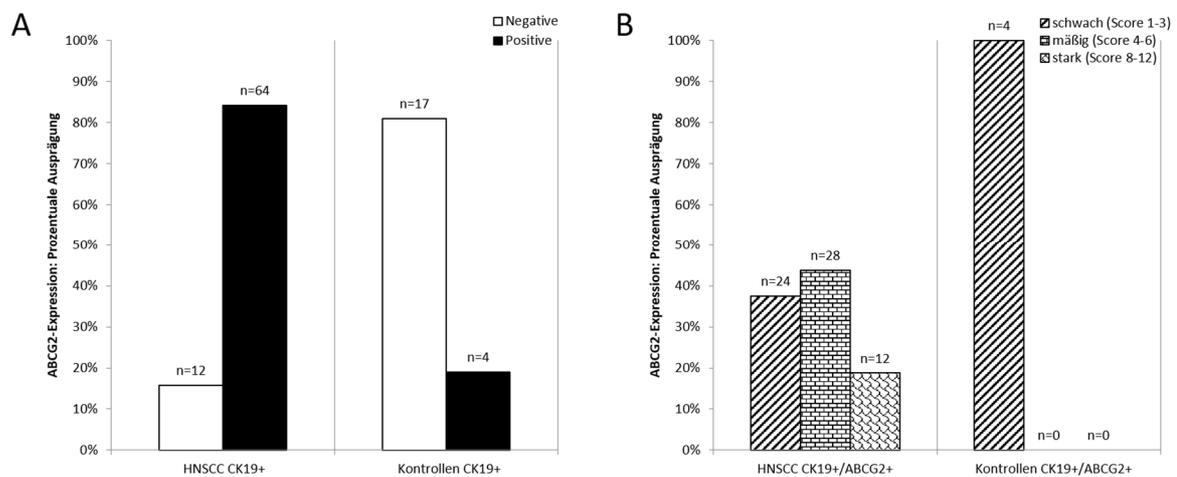


Abbildung 21. ABCG2 Expression in CK19+ HNSCC und CK19+ Kontrollen

A: Verhältnis von ABCG2 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der CK19/ABCG2 doppelt positiven Proben in die 3 Scoring-Gruppen der ABCG2 Färbung: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils ABCG2 und CK19 doppelt positiven HNSCC/Kontrollen. Die ABCG2-Expression in CK19+ HNSCC und CK19+ Kontrollen unterschied sich auf einem statistisch signifikanten Niveau (A und B: $p < 0,001$, Chi-Quadratstest unter Einschluss der negativen Ergebnisse).

Betrachtet man die Expression von ABCG2 in CK19+ HNSCC und Kontrollen, zeigt sich eine signifikant häufigere und höhere Expression von ABCG2 in CK19+ HNSCC ($p < 0,001$; Abb. 21). Der Großteil der CK19+ HNSCC exprimierte ABCG2 mind. mäßig bis stark (n=40, 53% aller CK19+ HNSCC bzw. 63% der CK19+/ABCG2+ HNSCC (Abb. 21 B), während 81% der CK19+ Kontrollen ABCG2 negativ waren (n=17). Vergleicht man CK19+ und CK19- HNSCC, so exprimierten letztere ebenfalls in 91% ABCG2 (n=20) und zeigten ähnlich wie die CK19+ HNSCC in 55% der Fälle (n=12; 60% der CK19-/ABCG2+ HNSCC) eine mind. mäßiggradige Expression mit sogar einem relativ höheren Anteil an starker Expression (36%, n=8 bzw. 40% der CK19-/ABCG2+ HNSCC) gegenüber den CK19+ HNSCC (16%, n=12; 19% der CK19+/ABCG2+ HNSCC). Zugunsten der Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse der

CK19- HNSCC nicht graphisch gezeigt. Die ABCG2-Expression in 76 CK19+ und 22 CK19- HNSCC unterschied sich nicht in signifikantem Ausmaß ($p > 0,05$). Weitere Details können Tabelle 16 im Anhang entnommen werden.

Ki-67:

Betrachtet man die Expression von ABCG2 in Abhängigkeit des Ki-67-Status, so fällt auf, dass Ki-67+ HNSCC den ABCG2 Transporter vermehrt exprimieren. 56% der Ki-67+ HNSCC exprimierten ABCG2 mind. mäßig bis stark ($n=46$). Während die Kontrollen mit positivem Ergebnis für Ki-67 überwiegend keine ABCG2-Expression aufwiesen (85%, $n=11/13$). Die Gruppen der Ki-67+ HNSCC und Ki-67+ Kontrollen unterschieden sich in ihrer ABCG2-Expression in signifikantem Ausmaß ($p < 0,001$; Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher; Abb. 46 im Anhang). Betrachtet man die Ausprägung der positiven Ergebnisse differenzierter, ergab sich in Ki-67+ HNSCC ein sehr ähnliches Expressionsprofil bzw. Verteilungsmuster von ABCG2 wie in der Gruppe der CK19+ HNSCC (siehe vergleichend Abb. 21).

Die Ki-67 negativen HNSCC ($n=2$) waren in je einem Fall positiv bzw. negativ für ABCG2, wobei das ABCG2+ Präparat nur eine schwache Expression zeigte. Allerdings lagen in HNSCC bezüglich der Ki-67-Expression sehr ungleiche Zahlenverhältnisse vor: Nur 2 Proben der HNSCC waren Ki-67 negativ, während 82 der 84 für Ki-67 auswertbaren HNSCC einen positiven Nachweis erbrachten. Dichotomisierte man das Ki-67-Ergebnis entsprechend des *Cut-off* Scores ≥ 4 für „Ki-67+“ (siehe auch Kapitel 4.2.4.1 und 4.2.1.8) ergaben sich ausgeglichene Zahlenverhältnisse mit 49 HNSCC_Ki-67 >3 = „positiv“ und 35 HNSCC_Ki-67 ≤ 3 = „negativ“. Für die ABCG2-Expression unter diesen Bedingungen ergab sich das in Tabelle 23 (tabellarischer Anhang) dargestellte Verhältnis, ebenfalls ohne Hinweis auf einen statistisch signifikanten Unterschied in der Expression von ABCG2 in Ki-67+ (Score >3) oder Ki-67- (Score 0-3) HNSCC ($p > 0,05$; Chi-Quadratstest).

Zugunsten der Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse der Ki-67 negativen HNSCC nicht graphisch gezeigt. Weitere Details sind Tabelle 16 im Anhang zu entnehmen.

p53:

Betrachtet man die Expression von ABCG2 in Abhängigkeit von der p53 Expression (Abb. 47 im graphischen Anhang), so zeigte sich ABCG2 in beiden Gruppen gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe überexprimiert. Vergleicht man die beiden p53-Gruppen untereinander fällt auf, dass die p53+ HNSCC noch häufiger positiv für ABCG2 waren (87%, $n=58$ vs. 84%, $n=26$) und semiquantitativ betrachtet

eine noch höhere ABCG2-Expression aufwiesen (Score >3: 58%, n=39 vs. 42%, n=13). Der Anteil an mäßiggradiger und starker Expression war in p53 positiven (p53+) HNSCC relativ erhöht. Bei den p53 negativen (p53-) HNSCC überwog der Anteil von HNSCC mit schwacher ABCG2-Expression. Schlussendlich konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von ABCG2 in p53+ und p53- HNSCC festgestellt werden (p=0,723; Chi-Quadratstest).

Vergleicht man die Expression von ABCG2 in p53- Kontrollen und p53+ Kontrollen ergibt sich ein signifikanter Unterschied (p=0,028; Exakter Test nach Fisher): Während im Großteil der p53- Kontrollen ABCG2 nicht nachgewiesen werden konnte (n=15/16; 94%), waren 3 von 5 p53+ Kontrollen positiv für ABCG2 (60%). Sowohl bei HNSCC als auch bei Kontrollen mit positivem p53-Nachweis zeigte sich gegenüber der Vergleichsgruppe mit negativem p53-Status eine relativ höhere ABCG2-Expression.

Vergleicht man die ABCG2-Expression in HNSCC und Kontrollen dichotomisiert nach ihrem p53-Status, ergibt sich für den Vergleich von p53- Kontrollen mit p53- HNSCC ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und HNSCC (p<0,001; Chi-Quadratstest): 26 von 31 p53- HNSCC waren ABCG2 positiv (84%), während bei den p53- Kontrollen 15 von 16 ABCG2 negativ waren (94%). Unabhängig vom p53 Status zeigten 100% der Kontrollen mit positivem Nachweis von ABCG2 maximal ein schwaches ABCG2 Färbeergebnis.

Für den Vergleich von p53+ HNSCC mit p53+ Kontrollen konnte kein eindeutiger statistischer Unterschied in der ABCG2 Expression festgestellt werden, was sicherlich auch an der vergleichsweise geringen Anzahl an p53+ Kontrollen lag (n=5). Ähnlich wie im Vergleich von p53- HNSCC und p53- Kontrollen zeigten die HNSCC eine häufigere und stärkere ABCG2-Expression: 2/5 der p53+ Kontrollen waren negativ, die übrigen 3 p53+ Kontrollen waren schwach positiv für ABCG2. Während die p53+ HNSCC zu 58% der Fälle eine mindestens mäßiggradige ABCG2-Expression zeigten und nur in 13% ein negatives Ergebnis aufwiesen.

ABCG2-Expression in CK19+, Ki-67+/- und p53+/- HNSCC und Kontrollen - Fazit

Abschließend ergaben die Co-Färbungen von HNSCC und Kontrollen die folgenden Beziehungen: Es konnte weder zwischen HNSCC mit unterschiedlicher p53-Expression (p53+ vs. p53-) noch im Vergleich mit der jeweiligen zugehörigen Kontrollgruppe gesunder Mukosa ein eindeutiger, statistisch signifikanter Unterschied in der ABCG2-Expression festgestellt werden. Auch wenn eine Tendenz von vermehrter

ABCG2-Expression in p53+ Kontrollen und HNSCC gegenüber der Vergleichsgruppe der p53 Negativen auffiel.

Für Ki-67 wurde eine Korrelation von vermehrter Ki-67-Expression und ABCG2-Expression in HNSCC beobachtet, während Ki-67+ Kontrollen keine vermehrte ABCG2-Expression zeigten. Dies lässt darauf schließen, dass eine Co-Expression von Ki-67 und ABCG2 fast ausschließlich in Tumoren zu finden ist. Vergleich man die ABCG2-Expression in Ki-67+ und Ki-67- HNSCC, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Folglich schien es keinen eindeutigen Zusammenhang von Ki-67 und ABCG2-Expression in HNSCC zu geben.

Auch für CK19 konnte keine belegbare Beziehung zwischen CK19-Expression und ABCG2-Expression in HNSCC festgestellt werden. CK19- und CK19+ HNSCC unterschieden sich in ihrer ABCG2-Expression kaum. Allerdings fiel auf, dass die meisten CK19+ Kontrollen ohne ABCG2-Expression blieben. Eine Co-Expression von ABCG2 und CK19 scheint somit fast ausschließlich HNSCC vorbehalten zu sein.

4.2.3 Zytokeratin 19 (CK19)

Die Färbung mit CK19 führte zu einer überwiegend zytoplasmatischen Anfärbung, teilweise aber auch einer membranären Anreicherung: CK19 ist ein Intermediärfilament und daher typischerweise zytoplasmatisch nachweisbar [73], so auch in den von uns untersuchten 98 HNSCC und 21 Kontrollen (Tab. 19 im Anhang). 97% der CK19+ HNSCC wiesen eine zytoplasmatische Färbung auf, 88,2% mit reiner Färbung des Zytoplasmas und 9,2% mit zytoplasmatischer und membranärer Anreicherung von CK19. 100% der Kontrollen zeigten eine zytoplasmatische Färbung für CK19.

Abbildung 22 zeigt je beispielhaft 3 Färbeergebnisse für CK19: schwache Färbung (Score 1-3), mäßige Färbung (Score 4 u. 6) und starke Färbung (Score 8, 9, 12). Ab einem Score von 4 wurde das Ergebnis als Überexpression gewertet, allerdings ergaben sich im Verlauf auch Hinweise, dass erst ein stärkeres Färbeergebnis wirklich signifikant für eine Überexpression gegenüber den Kontrollgeweben gewertet werden sollte (siehe Kapitel 4.2.3.1).

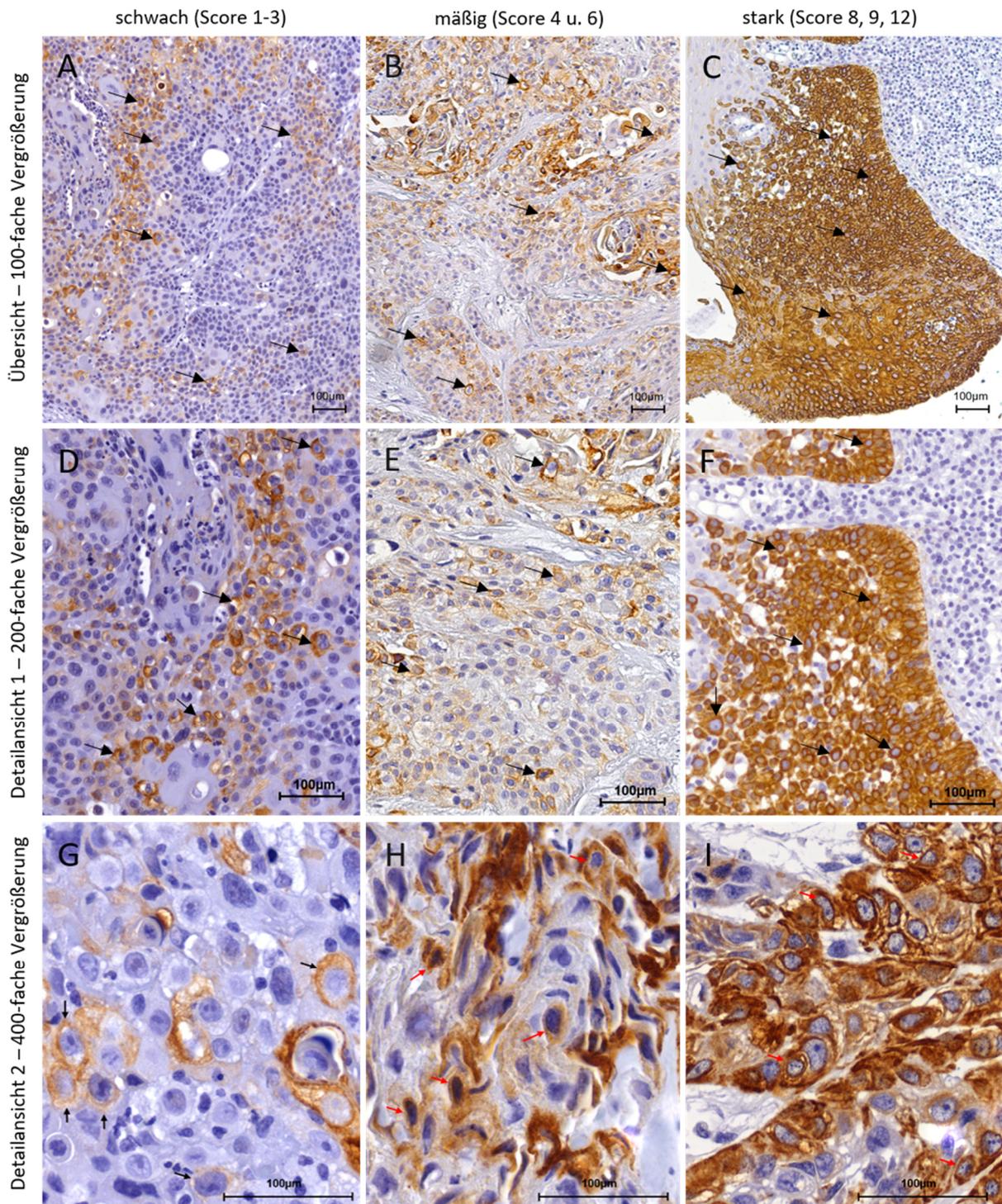


Abbildung 22. Exemplarische Übersichts- und Detail-Darstellungen der immunhistochemischen Ergebnisse für CK19 an 3 Beispielen, je nach Färberegebnis-Score. **A, D:** OPH 3, Primarius, 5-10% + cp; **B, E:** HPH 13, Rezidiv, 25% + cp; **C, F:** HPH 14, Rezidiv 100% ++ cp; **G:** OPH 14, Primarius, 5% ++ cp; **H:** LAR 28, Primarius, 50% ++ cp; **I:** OPH 6, Primarius, 75% ++ cp. Die Pfeile zeigen exemplarisch auf das für CK19 positiv angefärbte Zytoplasma einiger Tumorzellen.

(cp = zytoplasmatisch, HPH = Hypopharynx, LAR = Larynx, OPH = Oropharynx, + = einfach positiv, ++ = zweifach positiv)

4.2.3.1 CK19 – Expression positiv/negativ

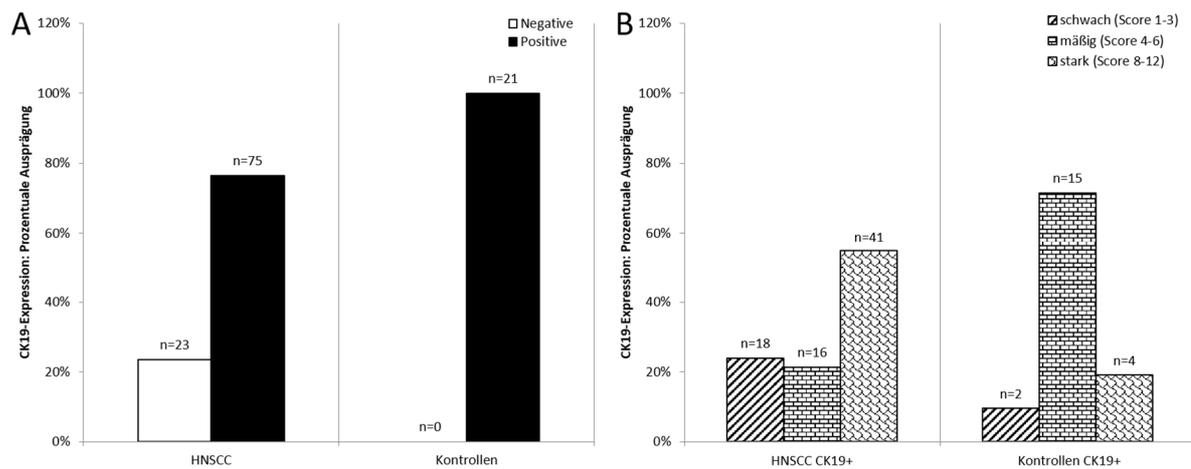


Abbildung 23. CK19 Expression – HNSCC vs. Kontrollen

A: Verhältnis von CK19 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der positiven Färberegebnisse für CK19 in die 3 Scoring-Gruppen: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils CK19 positiven HNSCC/Kontrollen.

Die beobachteten Unterschiede in der CK19-Expression zwischen HNSCC und Kontrollen zeigten sich statistisch signifikant (Exakter Test nach Fisher, A: $p=0,012$; B: $p<0,001$), siehe auch Tab. 18 im Anhang.

In der statistischen Analyse konnte bestätigt werden, dass die CK19-Expression sich in HNSCC und Kontrollen signifikant unterscheidet ($p=0,012$; Exakter Test nach Fisher): Betrachtete man die Expression von CK19 in HNSCC und Kontrollen ergab sich in beiden Gruppen eine überwiegend positive Expression des Markers (Abb. 23). Die Unterschiede zwischen den beiden Kohorten bestanden einerseits in einer unterschiedlichen Verteilung der positiven Ergebnisse bezüglich der Ausprägung des Färberegebnisses (Scoring) und andererseits darin, dass negative Kontroll-Präparate fehlten. 100% der Kontrollen waren positiv für CK19, 90% hatten einen Färberegebnisscore für CK19 von >3 . Die größte Subgruppe der Kontrollen bildeten die Präparate mit mäßigem Färberegebnis ($n=15$, 71%). 19% der Kontrollen zeigten sogar eine starke CK19-Expression. Demgegenüber lag bei 42% aller HNSCC-Proben (55% der CK19+ HNSCC) ein starkes CK19 Ergebnis vor, bei insgesamt 58% HNSCC mit einem Score >3 (76% der CK19+ HNSCC). 23% der HNSCC wiesen ein negatives Ergebnis auf.

Aufgrund des CK19-Expressionsprofils in den Kontrollen, schien ein höher angelegter *Cut-off* für eine Überexpression von CK19 sinnvoll: Es ist anzunehmen, dass erst ein Score >6 (starke Färbung) eine verstärkte CK19-Expression widerspiegelt. Wurde nach Score >6 und Score ≤ 6 dichotomisiert (Tabelle 8), waren 42% der HNSCC „positiv“, während nur 19% der Kontrollen ein starkes und somit „positives“ Ergebnis aufwiesen. Dieser beobachtbare Unterschied bezogen auf eine starke Expression von CK19 zeigte sich wenn auch knapp nicht signifikant ($p=0,051$;

Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest). Betrachtete man jedoch nur die CK19+ HNSCC und Kontrollen unter Ausschluss der vollständig für CK19 negativen Proben, waren die Unterschiede zwischen „positiver“ Expression (Score >6) und Score 1-6 statistisch signifikant ($p=0,004$, Chi-Quadratstest).

Tabelle 8. CK19 Score < 8 vs. 8-12 – HNSCC vs. Kontrollen

CK19	HNSCC	Kontrollen	gesamt
Score 8-12	41	4	45
Score < 8	57	17	74
gesamt	98	21	119

Die Kreuztabelle zeigt das Verhältnis der CK19 „positiven“ und „negativen“ HNSCC unter Berücksichtigung des Grenzwerts für ein positives Ergebnis von CK19 erst ab einem Score von 8 und größer, also einem starken Ergebnis. Es ergab sich knapp ein nicht signifikanter Unterschied zwischen HNSCC und Kontrollen unter diesen Bedingungen ($p=0,051$, Chi-Quadratstest).

Schlussendlich bleibt festzuhalten, dass sowohl Kontrollen als auch HNSCC eine vermehrte CK19-Expression zeigten, wobei allerdings das Ausmaß der CK19-Expression in den Kontrollen mit prominenter mäßiger Färbung zunächst überraschte. HNSCC zeigten eine deutlich stärkere Expression in den positiven Ergebnissen, wiesen aber gegenüber den 0% negativen Kontrollen auch in 23% CK19 negative Tumorseiten auf. HNSCC und Kontrollen unterschieden sich in ihrem CK19-Expressionsprofil signifikant.

Auch andere Studien konnten eine vermehrte Expression bzw. Überexpression von CK19 in HNSCC feststellen [49, 223], dies ist im Einklang mit unseren Daten. Auffällig war hierbei insbesondere die starke CK19-Expression mit 55% aller CK19+ HNSCC. Interessant blieb weiterhin, warum keine der Kontrollen absolut negativ für CK19 war, aber in 23% der HNSCC kein immunhistochemischer Nachweis von diesem gelang. Am ehesten kann dies dadurch erklärt werden, dass eine Expression von CK19 in normalen Epithelien mit insbesondere auch vermehrter Expression in inflammatorischen und hyperplastischen Geweben beschrieben wird [49, 193, 242]. Berücksichtigt man, dass der Großteil unserer Kontrollpräparate im Rahmen einer Tonsillektomie gewonnen wurden und wertet die Indikationsstellung einer Tonsillektomie, ist eine erhöhte entzündliche Aktivität bei chronischer oder rezidivierender Entzündung anzunehmen. Folglich könnte dies ursächlich dafür sein, dass alle Kontrollgewebe ein positives und häufig sogar mäßiges Ergebnis für CK19 lieferten. Speziell über die Expression von CK19 im Epithel der Tonsillenregion (Tonsilla palatina) konnte keine Literatur gefunden werden. Allerdings sind auch hier typischerweise Basalzellen positiv gefärbt. Auf den methodischen Aspekt der

günstigeren Auswahl eines diverseren Kontrollkollektivs zu Gunsten einer besseren Vergleichbarkeit wurde bereits in 4.1.8 eingegangen. Zudem ist eine vergleichsweise Überbewertung der Expression in den nicht-maligne veränderten Epithelien gegenüber der Relation zum Tumorgewebe in SCC möglich.

In der Literatur wird beschrieben, dass nicht alle HNSCC, aber deren Großteil, je nach Methodik zwischen 67-95% eine CK19-Überexpression auf mRNA oder Proteinebene aufweisen [193, 201, 223], dies ist im Einklang mit unseren Daten. Teilweise werden aber auch Ergebnisse von weniger als 50% positiver Proben beschrieben [193, 201, 223]. Bei dieser breiten *Range* an Ergebnissen spielen sicher auch die verschiedenen verwendeten Methoden, die unterschiedlichen Bewertungskriterien und insbesondere auch die Wahl möglicher *Cut-off* Werte eine Rolle. Eine weitere mögliche Erklärung der negativen HNSCC Proben könnte darin liegen, dass CK19 vermehrt in nicht-verhornenden SCC und geringer differenzierten HNSCC exprimiert wird und in verhornenden Läsionen und gut differenzierten Carcinomen eher gering oder nicht nachweisbar ist [160, 181, 242, 265].

4.2.3.2 CK19 – Expression in HNSCC und T-Stadium

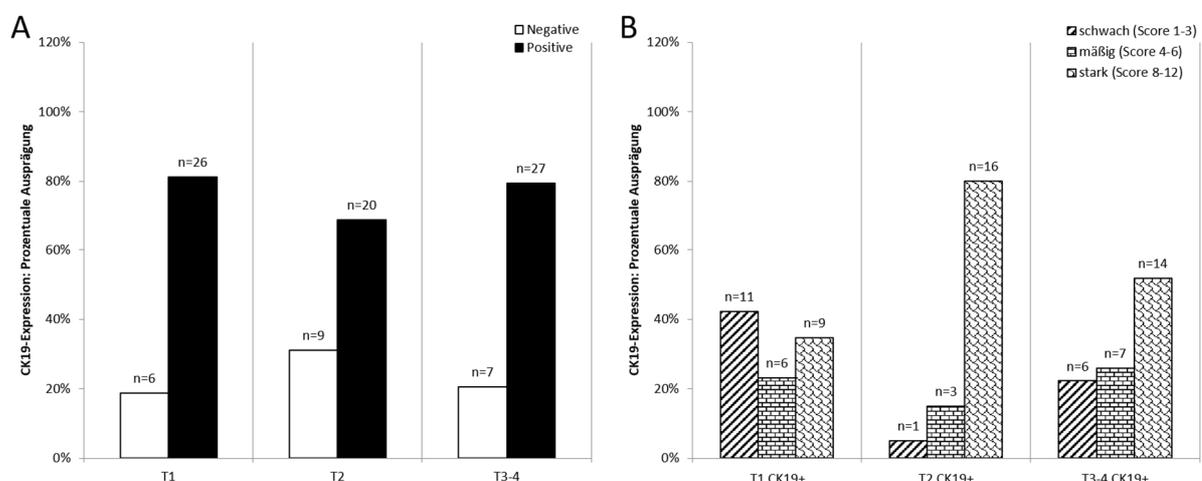


Abbildung 24. CK19 Expression – Korrelation mit T-Stadium

A: Verhältnis von CK19 positiven und negativen Proben in HNSCC. **B:** Differenzierung der positiven Färberegebnisse für CK19 in die 3 Scoring-Gruppen: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils CK19 positiven T1/T2/T3-4 HNSCC.

Die beobachteten Unterschiede in der CK19-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium zeigten sich statistisch nicht signifikant (A: $p=0,476$; Chi-Quadratstest). Unterschiede in den Scores zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen (B: $p=0,021$; Exakter Test nach Fisher).

Betrachtet man die Expression von CK19 in HNSCC in Abhängigkeit vom T- Stadium, so ergibt sich eine Zunahme der Expression mit Zunahme des T-Stadiums, insbesondere bei Betrachtung der starken Expression, Score >6 (Abb. 24). Diese Unterschiede in der Ausprägung der Färberegebnisse zwischen den verschiedenen Gruppen (T1, T2, T3-4) zeigten sich als statistisch signifikant ($p=0,021$).

Auch andere Studiengruppen konnten einen solchen Zusammenhang von Progress der Tumorerkrankung und vermehrter CK19-Expression beobachten [235]. Andere Gruppen hingegen konnten diesbezüglich keinen signifikanten Zusammenhang feststellen [73, 265], fanden aber eine signifikante Korrelation von ungünstiger Prognose und CK19-Expression in SCC der Mundhöhle, unabhängig von Primarius und Lymphknotenstatus [73].

4.2.3.3 CK19 – Expression in HNSCC und N-Stadium

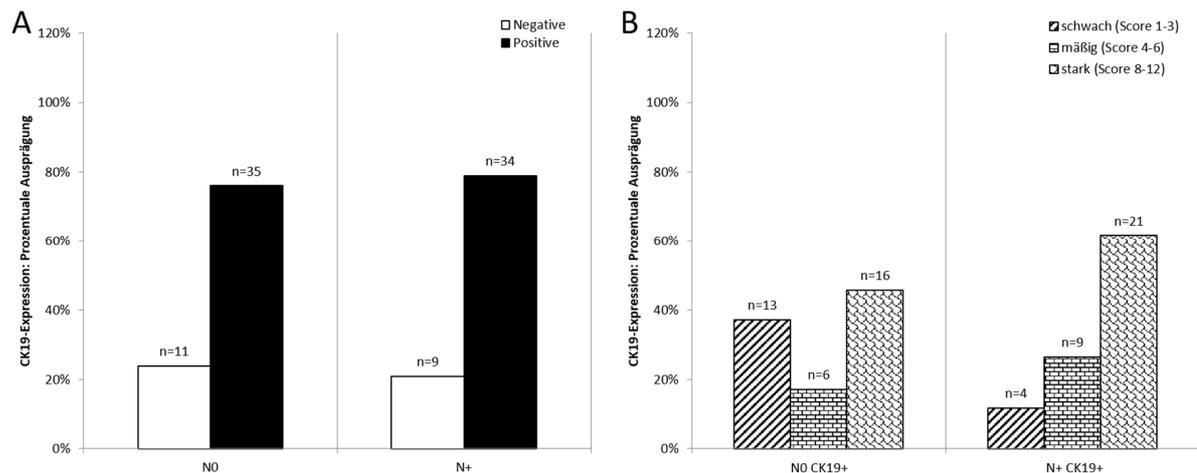


Abbildung 25. CK19 Expression – Korrelation mit N-Stadium

A: Verhältnis von CK19 positiven und negativen Proben in Abhängigkeit von der regionären Metastasierung (N0 vs. N+). **B:** Differenzierung der Färberegebnisse für CK19 in die 3 Scoring-Gruppen: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils CK19 positiven N0/N+ HNSCC.

Die beobachteten Unterschiede in der CK19-Expression in Abhängigkeit vom N-Status waren nicht statistisch signifikant (A: $p=0,73$; Chi-Quadrattest), Unterschiede in den Scores zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen (B: $p=0,049$; Chi-Quadrattest).

Die Expression von CK19 in HNSCC in Abhängigkeit vom N-Status (N0 HNSCC vs. N+ HNSCC) bot ein ähnliches Bild wie zuvor für T beobachtet. Die CK19-Expression nahm in HNSCC bei Vorliegen von regionären Metastasen signifikant zu: N+ HNSCC zeigten in 49% der Fälle eine starke Expression von CK19 und damit eine Überexpression ($n=21$, 62% der N+/CK19+ HNSCC, Abb. 25 B), wohingegen N0 HNSCC nur in 35% eine solch starke Expression aufwiesen ($n=16$, 46% der N0/CK19+ HNSCC, Abb. 25 B). Während sich bezüglich des positiven und negativen Ergebnisses kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ergab, bestand ein signifikanter Unterschied im Grad der Ausprägung des Färberegebnisses (Scoring, Abb. 25 B).

Andere Arbeitsgruppen konnten diesbezüglich keinen signifikanten Zusammenhang beobachten [235, 265], allerdings wurde in diesen Arbeiten lediglich zwischen positivem und negativem Ergebnis unterschieden und nicht auf die Ausprägung des Ergebnisses bzw. den zunehmenden Prozentsatz an positiv gefärbten Tumorzellen geachtet. Des Weiteren könnte dies auf eine geringere Anzahl untersuchter

Tumorproben und auf methodische Unterschiede bei der Definition der Grenzwerte sowie auf verschiedene Techniken zur Bestimmung der Zytokeratinexpression auf RNA- und Proteinebene zurückzuführen sein.

4.2.3.4 CK19 – Expression in HNSCC und Grading

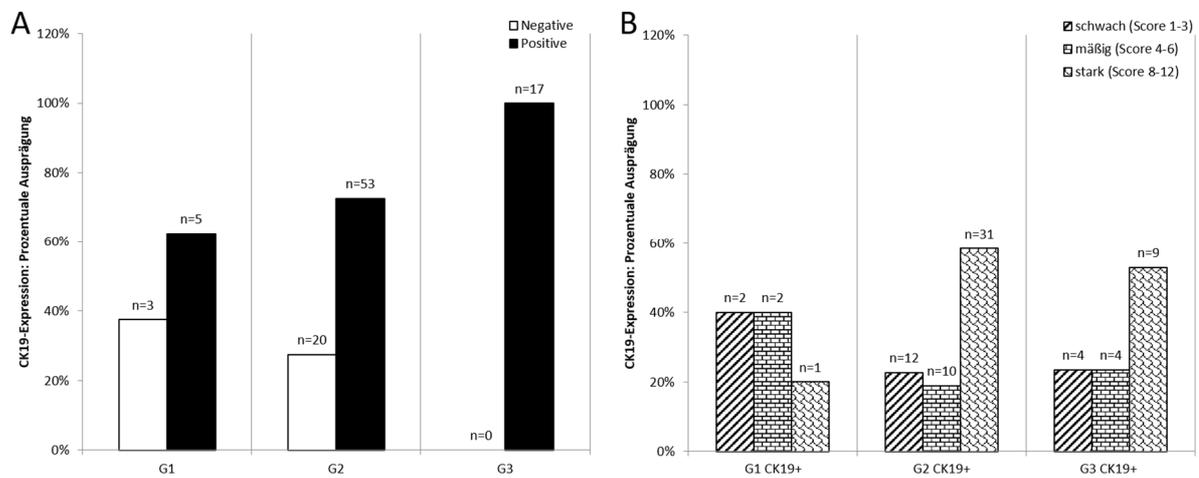


Abbildung 26. CK19 Expression – Korrelation mit Differenzierungsgrad G

A: Verhältnis von CK19 positiven und negativen Proben in HNSCC. **B:** Differenzierung der positiven Färbeergebnisse für CK19 in die 3 Scoring-Gruppen: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils CK19 positiven G1/G2/G3 HNSCC.

Die beobachteten Unterschiede in der CK19-Expression in Abhängigkeit vom *Grading* zeigten sich statistisch signifikant (A: $p=0,013$; Exakter Test nach Fisher), die Unterschiede in den verschiedenen Ausprägungen des positiven Ergebnisses zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (B: $p=0,486$, Exakter Test nach Fisher). Bezog man die negativen Ergebnisse mit ein, zeigten sich die Unterschiede in den Gruppen wieder als statistisch signifikant ($p=0,048$, Exakter Test nach Fisher).

CK19 gilt allgemein hin als ein Marker der Entdifferenzierung [49, 242] und wird mit dem Vorliegen und Erhalt eines Stammzell-ähnlichen Phänotyps in Verbindung gebracht [131]. Während CK19 in gesunder Schleimhaut, vornehmlich in Basalzellen exprimiert wird, ist eine zunehmende suprabasale Expression mit einer Veränderung des Zellverhaltens und prämaligen Veränderungen assoziiert. Bereits bei Inflammation und Hyperplasie wird eine vermehrte Expression beobachtet, diese bleibt in der Regel aber auf die Basalzellschicht begrenzt. Ab milden dysplastischen Veränderungen wird auch eine vereinzelte suprabasale Expression gesehen. Mit zunehmender Dysplasie wird CK19 in mehr suprabasalen Zellen, stärker exprimiert [131, 193, 242]. Dies konnte sowohl auf Protein als auch auf Transkriptebe nachgewiesen werden [25, 49, 242, 265]. In SCC ist eine Zunahme der CK19-Expression mit Zunahme von Tumorgrading [265] und Progress der Tumorerkrankung assoziiert [193]. CK19 kann in SCC im gesamten Epithel und allen invasiven Tumoranteilen gefunden werden [265].

Betrachtet man die Expression von CK19 in den von uns untersuchten HNSCC unterschiedlicher Differenzierung (Abb. 26) so fällt auf, dass nicht nur der Anteil an

CK19+ HNSCC, sondern auch der Anteil an stark-CK19-exprimierenden HNSCC mit zunehmender Entdifferenzierung zunimmt. Während bei den G1 HNSCC der Anteil mit starker CK19-Expression mit 13% (n=1, 20% der G1/CK19+) noch in etwa dem Anteil der Kontrollen mit starker CK19-Expression (19%, n= 4/21) entsprach. So lag der Anteil an stark-exprimierenden Tumoren in der Subgruppe der G2 und G3 HNSCC mit 58% bzw. 53% der CK19+ HNSCC sogar fast dreimal so hoch wie der Anteil der stark CK19 exprimierenden Kontrollen. Zusätzlich war keines der G3 HNSCC negativ für CK19, während in 27% der G2 Tumore und sogar in 38% der G1 HNSCC kein CK19 Nachweis erfolgen konnte. Die CK19-Expression unterschied sich in den verschiedenen *Grading*-Subgruppen signifikant ($p=0,013$). Insbesondere die beobachteten Unterschiede in der CK19-Expression zwischen G1 und G3 ($p=0,024$; Exakter Test nach Fisher) sowie G2 und G3 Tumoren ($p=0,010$; Exakter Test nach Fisher) unterschieden sich in statistisch signifikantem Ausmaß (Abb. 26 A).

Somit wiesen auch unsere Daten daraufhin, dass CK19 in undifferenzierten HNSCC überexprimiert wird und mit Zunahme der Entdifferenzierung bzw. geringerem *Grading* vermehrt exprimiert wird, diese Ergebnisse sind kongruent mit Arbeiten anderer Arbeitsgruppen [49, 131, 193, 235, 242, 265]. Eine Überexpression von CK19 wird mit hoher Tumorproliferationsrate und schlechterer klinischer Prognose in Verbindung gebracht [73, 235, 265].

Wertete man CK19 erst ab einer starken Expression (Score 8-12) als positiv und die übrigen Proben als negativ, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tab. 24 im Anhang).

4.2.3.5 **CK19 – Expression in HNSCC und Korrelation mit klinischen Parametern – Fazit**

Zytokeratin 19 (CK19) ist ein epithel-spezifisches Intermediärfilament und ist als solches an Zellintegrität und Zell-Zell-Verbindungen beteiligt [75].

Zytokeratine werden je nach Epithel spezifisch exprimiert und können in ihrem Expressionsmuster Hinweise auf die Organzugehörigkeit geben [153, 178, 223, 237]. Aber auch innerhalb eines Gewebes kann, abhängig von der zellulären Differenzierung und Reifung der Zellen, eine Änderung der Zytokeratinexpression in den einzelnen Epithelkompartimenten beobachtet werden [131, 223], auch im Rahmen der Tumorigenese werden Änderungen im Zytokeratin-Expressionsprofil von Epithelzellen beobachtet [223]. CK19 wird in gesunder Schleimhaut des Aerodigestivtrakts, vormerklich in Basalzellen exprimiert [131, 150, 193, 242, 265] und ist hier Ausdruck des bestehenden Proliferationspotenzials und der Undifferenziertheit

der Zellen [193]. Zudem ist CK19 in normalem Drüsenepithel sowie in undifferenzierten Stammzellen nachweisbar [131, 150, 193]. Inflammation, Dysplasie und maligne Entartung führen jedoch zu einer vermehrten CK19-Expression in nicht-verhornenden Epithelien des oberen Aerodigestivtraktes: Während es bei Inflammation und milder Dysplasie bei einer vermehrten Expression in der Basalzellschicht bleibt, wird mit Fortschreiten der dysplastischen Veränderungen eine verstärkte und zunehmend auch suprabasale Färbung des Epithels beobachtet [25, 49, 131, 150, 242, 265], bis hin zur lückenhaften Färbung des gesamten Epithels bei schwerer Dysplasie und CIS [242]. Gesunde orale Epithelien exprimieren suprabasal für gewöhnlich vornehmlich CK1 und 10 [193], aber kein CK19. Eine suprabasale Expression von CK19 weist somit auf prämaligne Veränderungen und eine gestörte Stammzellverteilung hin [73, 150] und ist so Ausdruck einer beginnenden malignen Transformation. Je nach Ausprägung erlaubt sie dabei Rückschlüsse auf Proliferationsneigung und Grad der dysplastischen Veränderungen [131, 150, 265]. Eine CK19-Überexpression wurde auch in mit HPV infizierter, menschlicher oraler Mukosa beschrieben, blieb aber auch in dieser zunächst auf die Basalzellschicht begrenzt [116]. In den meisten SCC zeigt sich, in Übereinstimmung mit unseren Daten, eine Überexpression von CK19 [49, 223]. Mit Zunahme der dysplastischen Veränderungen, des *Grading* und des Tumorprogresses wird auch hier eine zunehmende homogene, zytoplasmatische Färbung des Tumorgewebes für CK19 beobachtet [49, 131, 150, 242, 265].

Zu den Charakteristika von CK19, als Marker der Entdifferenzierung [49, 242] und seiner Assoziation mit einem Stammzell-ähnlichen Phänotyp [131, 150], passt die normale Expression in Basalzellen gesunder Epithelien und Stammzellen sowie die verstärkte Expression in hochproliferativen, entzündlichen Läsionen sowie im Rahmen der malignen Transformation und in undifferenzierten Tumoren: So wird CK19 besonders von geringer differenzierten, nicht-verhornenden Plattenepithelkarzinomen exprimiert, wohingegen es in verhornenden Läsionen, mit Hyperkeratosis als Zeichen des hohen Zellumsatzes, aber auch der Differenzierung, kaum bis nicht nachweisbar ist [242].

Eine signifikante CK19-Überexpression wurde in HPV-positiven oropharyngealen SCC (OSCC) gegenüber HPV-negativen OSCC beobachtet und stellt somit einen hilfreichen Indikator für eine Hochrisikoinfektion mit HPV dar [195].

In der vorliegenden Studie konnten wir eine signifikant höhere Expression von CK19 in HNSCC gegenüber Kontrollen feststellen. Ebenso zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen Ausprägung der CK19-Expression in HNSCC und lokalem

Tumorstadium (T), dem Vorliegen von Lymphknoten-Metastasen und zunehmendem *Grading*. Diese Beobachtungen werden bezüglich Überexpression in HNSCC, Tumorstadium und *Grading* von Arbeiten anderer Studiengruppen gestützt [193, 219, 235, 265]. Diese und unsere Ergebnisse unterstreichen die Eigenschaft von CK19 als Marker undifferenzierter und progenitor- bzw. stammzell-ähnlicher Zellen und seine Bedeutung als Marker im Rahmen der Tumorigenese von SCC des oberen Aerodigestivtraktes. CK19 dient daher als hilfreicher Marker bei der Graduierung von Tumoren und kann insbesondere in Kombination mit anderen Markern möglicherweise Hinweise auf Proliferationsneigung, Aggressivität und Prognose der Tumorerkrankung liefern [73, 193, 235, 265]. Insbesondere aber auch bei der Einstufung prämaligener Läsionen und ihres Entartungspotenzials erscheint CK19 ein hilfreiches, ergänzendes *Tool* zur Abschätzung der prognostischen Bedeutung und besseren Graduierung zu sein [25, 49, 131, 150, 193, 242, 265]. Zhong et al. konnten eine CK19-Überexpression in tumorfernem Gewebe, welches im Rahmen der primären Operation entnommen wurde, mit häufigerer Tumorrezidivrate und schlechterer Prognose in Verbindung bringen ($p < 0,05$) [265].

Auch das im Serum lösliche Cytokeratin-Fragment von CK19 (CYFRA 21-1) wurde in HNSCC wiederholt als Marker für hohe Tumorlast bzw. Tumorgröße (T) sowie Fernmetastasierung (M) und Ausmaß der zervikalen Metastasierung (N) bestätigt [21, 102]. Erhöhte CYFRA 21-1 Serumspiegel sind Folge eines hohen Tumorzellumsatzes bzw. einer Tumorzellnekrose und folglich Abbild der Tumormasse [65]. Ein erneuter Anstieg nach erfolgreicher Therapie ist mit einer Tumorrezidivrate bzw. Krankheitsprogress assoziiert [12, 65, 79]. Es ist als Tumormarker bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs, aber insbesondere bei Lungenkarzinomen etabliert [8, 103]. Seine unabhängige prognostische Bedeutung für HNSCC wurde u.a. von Céruse et al. gezeigt: Hohe CYFRA 21-1 Serumspiegel waren mit einem verkürzten Gesamt-Überleben und einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert [40].

4.2.4 Ki-67

Abbildung 27 zeigt beispielhaft die immunhistochemischen Färbegergebnisse für Ki-67 entsprechend den Bewertungsgruppen des Scores: schwache Färbung (Score 1-3), mäßige Färbung (Score 4-6), starke Färbung (Score 8, 9, 12), in 3 Vergrößerungen. Ab einem Score >3 lag entsprechend der vorherigen Definition eine Überexpression vor und das Ergebnis war als relevant positiv zu betrachten. In der weiteren Auswertung

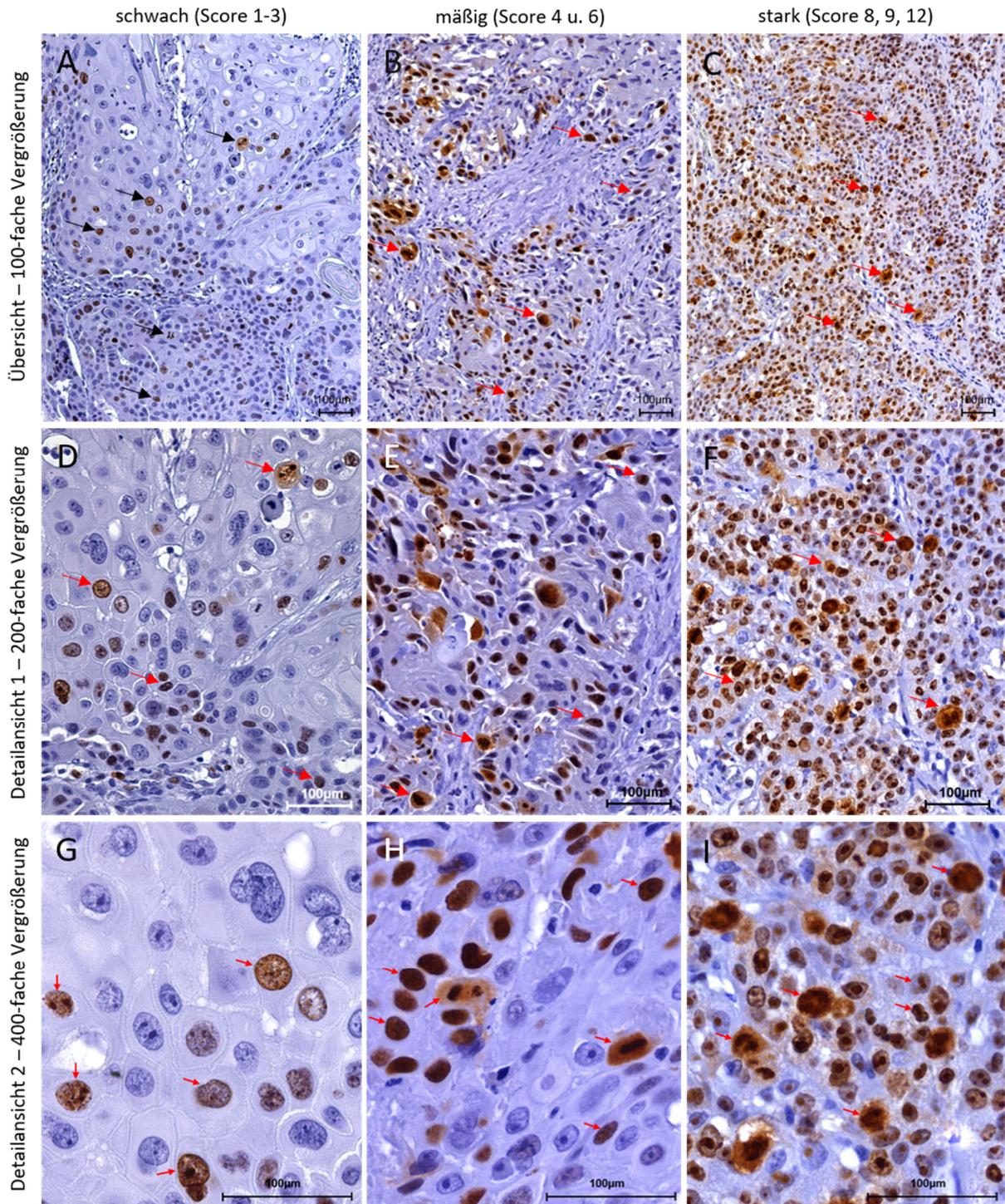


Abbildung 27. Exemplarische Übersichts- und Detail-Darstellungen der immunhistochemischen Ergebnisse für Ki-67, je nach Färberegebnis-Score bzw. Bewertungsgruppe. **A, D, G:** LAR 45, Rezidiv, 10% + n, G2; **B, E, H:** LAR 28, Primarius, 50% + n, G2; **C, F, I:** LAR 38, Primarius, 70% ++ n, G2. Die Pfeile zeigen exemplarisch auf einige der für Ki-67 positiv angefärbten Zellkerne der Tumorzellen. Gegen Ki-67 gerichtete Antikörper färben Zellen der Interphase und der Mitose an und markieren so die an der Proliferation des Tumors aktiv teilnehmenden Zellen. Zellen in der G0 Phase werden nicht markiert [80-81, 183].

(n = nukleär, LAR = Larynx, + = einfach positiv, ++ = zweifach positiv)

der Ergebnisse bestätigte sich im Vergleich mit der Kontrollkohorte dieser *Cut-off*-Wert für die Ergebnisbeurteilung als sinnvoll (siehe Kapitel 4.2.4.1).

Ki-67 ist eine typische nukleäre Färbung [121, 183]: 100% der Ki-67+ HNSCC und Kontrollen zeigten eine nukleäre Anreicherung, keine der Ki-67+ Kontrollen wies einen Score >3 auf (Tab. 20 im Anhang).

In den verschiedenen Phasen der Mitose verlagert sich das Protein Ki-67 vermehrt in Richtung des Chromatins und ummantelt dies, als Basis der perichromosomalen Schicht/Hülle [221], sodass dieses dunkler innerhalb des heller-gefärbten Zellkerns abzugrenzen ist, während sich Zellen in der Interphase homogener, granuliert anfärben [198]. In vielen Fällen wurde eine vermehrte Färbung der Randbereiche der invasiven Tumorsinseln beobachtet, insbesondere in den stark positiv gefärbten Tumoren zeigte sich eine diffuse Färbung im gesamten Tumorgewebe [114].

4.2.4.1 Ki-67 – Expression positiv/negativ

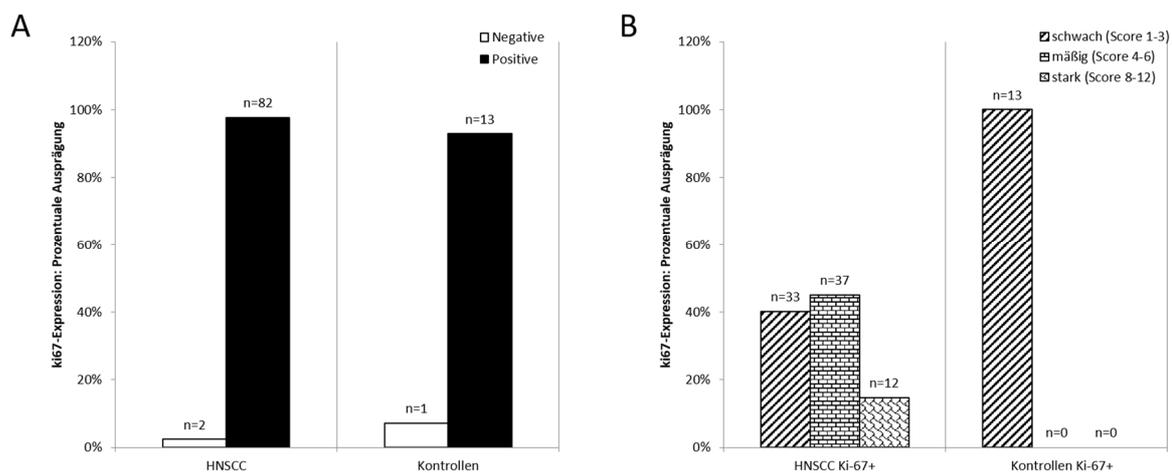


Abbildung 28. Ki-67 Expression – HNSCC vs. Kontrollen

A: Verhältnis von Ki-67 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der positiven Färberegebnisse für Ki-67 in die 3 Scoring-Gruppen: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils Ki-67 positiven HNSCC/Kontrollen.

Vergleicht man die Expression von Ki-67 nur nach positivem und negativem Ergebnis, ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen HNSCC und Kontrollen (A, $p=0,374$; Exakter Test nach Fisher). Vergleicht man aber die Ausprägungen des positiven Ergebnisses für Ki-67 in den beiden Gruppen, zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede (B, $p<0,001$; Exakter Test nach Fisher) (s.a. Tab. 20 im Anhang).

Abbildung 28 A zeigt den immunhistochemischen Nachweis von Ki-67 in den 98 HNSCC und den 21 Kontrollen. 14 Proben waren nicht beurteilbar. 82 der verbliebenen 84 HNSCC-Proben waren positiv für Ki-67 (98%). Nur 2% der auswertbaren HNSCC-Proben waren ohne Ki-67 Nachweis ($n=2$). Auch bei den Kontrollen wurde in 93% der Fälle Ki-67 nachgewiesen. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen HNSCC und Kontrollen festgestellt werden ($p=0,374$).

Differenzierte man jedoch das positive Färbeergebnis bezüglich dessen Stärke, fiel auf, dass bei den Kontrollen kein Ki-67-Ergebnis über einem Score von 3 lag, d.h. 0% der Kontrollkohorte exprimierten Ki-67 über ein schwaches Maß hinaus. Alle Ki-67 positiven (Ki-67+) Kontrollproben exprimierten Ki-67 in weniger als 10% des Tumors, 10 der 13 Ki-67+ Kontrollen (77%) lagen sogar noch deutlich darunter, im Bereich von 1, 2 und 5% Ki-67+ Tumorzellen. Für die HNSCC hingegen zeigte sich ein anderes Bild: 58% aller HNSCC und 60% der Ki-67+ HNSCC (n=49) wiesen eine Überexpression von Ki-67 auf (Tab. 9, Abb. 29), 15% eine starke Überexpression (Score >6) (Abb. 28 B).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein Expressions-Niveau von Ki-67 <10% bzw. ein Ergebnis-Score bis 3 als „normal“ betrachtet werden kann und somit erst eine Expression über einem Score von 4 einer Überexpression entspricht (siehe auch Kapitel 3.5, Tabelle 1 und Abbildung 2). Dies ist mit der aktuellen Literatur im Einklang [218] und wurde bei der weiteren Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt.

Tabelle 9. Ki-67 Score >3 vs. 0-3 – HNSCC vs. Kontrollen

	HNSCC	Kontrollen	gesamt
Ki-67+ (Score >3)	49	0	49
Ki-67- (Score <4)	35	14	49
gesamt	84	14	98

Die Kreuztabelle zeigt das Verhältnis von Ki-67 in HNSCC und Kontrollen unter Berücksichtigung des Grenzwerts für ein positives Ergebnis von Ki-67 ab einem Score >3. Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Ki-67-Expression zwischen HNSCC und Kontrollen festgestellt werden ($p < 0,001$; Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest).

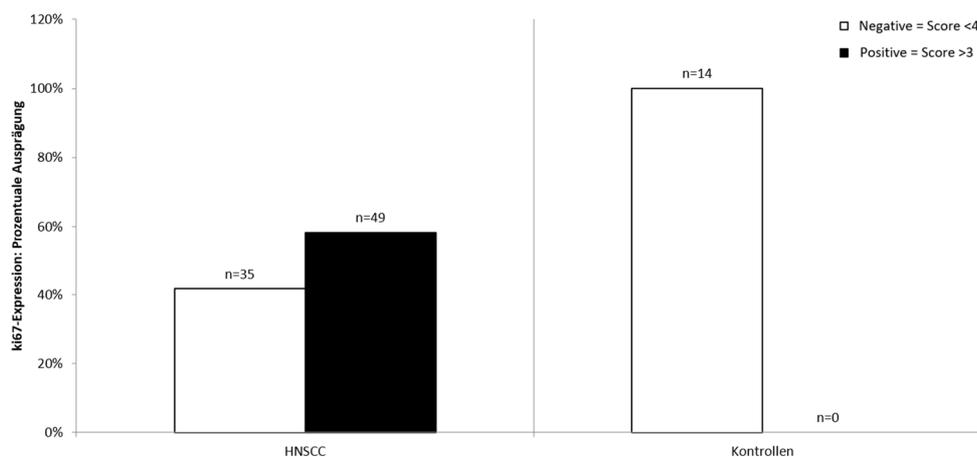


Abbildung 29. Ki-67 Score >3 vs. 0-3 – HNSCC vs. Kontrollen

Relative Expression von Ki-67 in HNSCC und Kontrollen unter Berücksichtigung des Grenzwerts für ein positives Ergebnis von Ki-67 ab einem Score >3. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied in der relativen Ausprägung des Merkmals Ki-67 zwischen HNSCC und Kontrollen ($p < 0,001$; Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest).

Oben stehende Abbildung 29 und Tabelle 9 zeigen das Verhältnis von Ki-67 positiven und negativen HNSCC und Kontrollen unter Berücksichtigung der soeben genannten Beobachtungen. Betrachtet man die Expression von Ki-67 erst ab einem Score von >3 als positiv, ergibt sich ein signifikanter Unterschied in der Ki-67-Expression zwischen HNSCC und Kontrollen ($p < 0,001$).

Unsere Daten sind im Einklang mit anderen Arbeiten. Auch Krecicki et al. konnten in einer retrospektiven Analyse an SCC des Larynx (LSCC, (*laryngeal squamous cell carcinoma*, (engl.)) im Vergleich mit prämaligen Läsionen sowie im Vergleich von gesundem und dysplastischem Gewebe einen signifikanten Zusammenhang von Ausprägung der Ki-67-Expression und Schweregrad der Läsion bzw. der Dysplasie feststellen. Eine hohe Expression von Ki-67 blieb Karzinomen vorbehalten, während auch in Normalgewebe, Hyperplasien und milden Dysplasien eine Ki-67-Expression nachgewiesen wurde, jedoch in sehr viel geringerer Ausprägung und das ausschließlich in der Basalzellschicht oder in parabasalen Zellen [121]. Auch andere Arbeiten konnten diesen Zusammenhang von Schweregrad der Dysplasie und zunehmender Ki-67-Expression nachweisen [114, 266]. Mit Zunahme der Dysplasie wird eine Zunahme von einer Färbung einzelner Zellen der Basalzellschicht in gesundem Gewebe und milden dysplastischen Veränderungen bis hin zu einer Anfärbung des gesamten Epithels in hochgradigen Dysplasien beschrieben [266]. Diese Befunde stützen die These, dass sich dysplastische und maligne Läsionen infolge abnormaler Proliferation epithelialer Zellen entwickeln [121].

Zudem konnten die Kollegen zeigen, dass es einen Unterschied im Ki-67 Färbemuster zwischen gut und schlecht differenzierten Tumoren gab. In gut und besser differenzierten Tumoren wurde Ki-67 insbesondere in der Peripherie der Tumorzellen nachgewiesen, der Invasionsfront, während in undifferenzierten Tumoren nicht nur ein größerer Teil der Tumorzellen angefärbt war, sondern sich auch ein heterogenes Färbemuster mit Nachweis von Ki-67 in der gesamten Tumormasse zeigte [121]. Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Zellen der invasiven Front den Basalzellen von normalem Epithel entsprechen, was vereinbar ist mit einer erhöhten Ki-67 Expression in diesem Bereich [216]. In unserer Arbeit war die Anzahl der G1-Tumoren so gering, dass wir diese Beobachtungen weder eindeutig bestätigen noch widerlegen konnten. In den von uns gefärbten HNSCC, großteils G2, war überwiegend eine eher diffuse Anfärbung in der gesamten Tumormasse zu beobachten, teilweise mit Betonung der Randbereiche. Unterscheidungsmerkmal in unseren Daten war eher die Zunahme des Prozentsatzes an positiven Zellen als die Lokalisation im Tumor. Jedoch

war insbesondere bei den Tumoren mit starker Färbung (Score >6) eine zunehmend heterogene Expression von Ki-67 positiven Zellen zu finden.

4.2.4.2 *Ki-67 – Expression in HNSCC und T-Stadium*

Bezüglich der T-Stadien war ein Unterschied in der Ki-67-Expression zwischen T1 und >T1 festzustellen. Waren im T1 Stadium nur 48% der HNSCC relevant Ki-67+ (Score >3), so traf dies auf 61% der T2 und 67% der T3-4 Tumore zu, während 0% der Kontrollen einen Score von >3 erreichten (Abb. 48 B und 49 im graph. Anhang). Allerdings war dieser Unterschied auch nach Dichotomisieren der Gruppen in T1 vs. >T1 nicht statistisch signifikant ($p=0,184$, Chi-Quadratstest). Weitere Zahlen sind Tabelle 20 im tabellarischen Anhang zu entnehmen.

Die Studienlage ist unschlüssig, ob ein belegbarer Zusammenhang zwischen zunehmender Ki-67-Expression und T-Stadium besteht. Während Mielcarek et al. und Acikalin und Kollegen einen eindeutigen signifikanten Zusammenhang zwischen T-Stadium und Ki-67-Expression bei SCC des Larynx nachweisen konnten [2, 151], fanden Izawa et al., so wie wir, keine eindeutige Korrelation von Tumorstadium und Ki-67-Expression [106].

4.2.4.3 *Ki-67 – Expression in HNSCC und N-Stadium*

Auch in Bezug auf den lokalen Lymphknotenstatus war eine verstärkte Färbung von Ki-67 in N+ HNSCC gegenüber N0 HNSCC zu beobachten: 69% der N+ HNSCC waren mäßig/stark-positiv für Ki-67, gegenüber 48% bei N0 HNSCC (Abb. 50 B und 51 im graphischen Anhang), allerdings zeigte sich auch dieser Unterschied in der Expression statistisch knapp nicht signifikant ($p=0,064$, Chi-Quadratstest). Die exakten Zahlen sind Tabelle 20 im tabellarischen Anhang zu entnehmen.

In der Literatur hingegen wird eine signifikante Mehrexpression von Ki-67 in Primärtumoren mit Assoziation zu Lymphknotenmetastasen beobachtet: Sowohl Re et al., Liu et al. (beide $p<0,001$) als auch Acikalin et al. und Cordes und Kollegen ($p=0,001$) konnten in ihren Studien einen signifikanten Zusammenhang von N-Stadium und Ki-67-Expression feststellen [2, 54, 135, 183].

4.2.4.4 Ki-67 – Expression in HNSCC und Grading

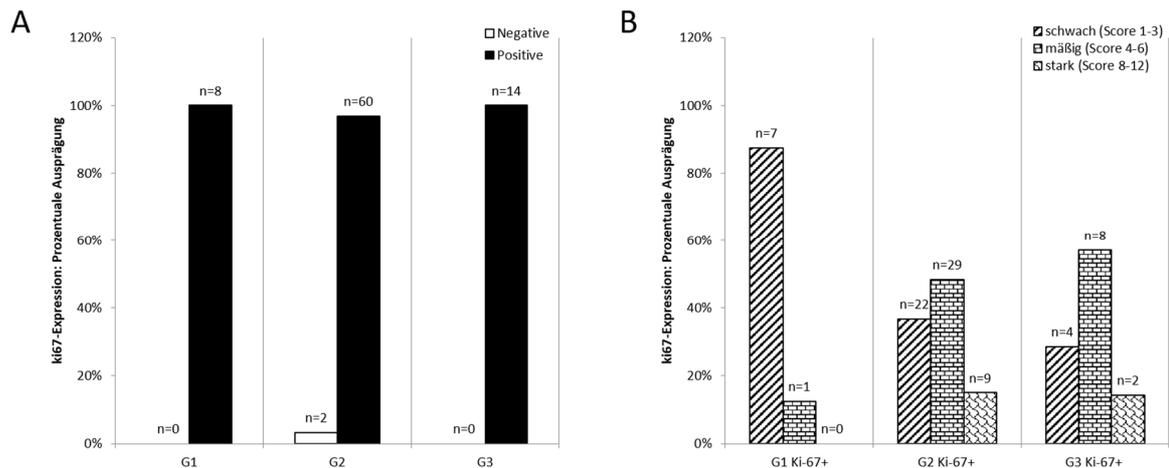


Abbildung 30. Ki-67 Expression – Korrelation mit Differenzierungsgrad G

A: Verhältnis von Ki-67 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der positiven Färbeergebnisse für Ki-67 in die 3 Scoring-Gruppen: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils Ki-67 positiven G1/G2/G3 HNSCC.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich einer positiven und negativen Ausprägung des Ki-67 Signals in den untersuchten Gruppen (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher, A: $p=1,0$; B: $p=0,093$). Weitere Zahlen siehe Tab. 20 im Anhang.

In Bezug auf das *Grading* war eine deutliche Zunahme der Ki-67 Färbung mit Zunahme der Undifferenziertheit zu beobachten. Während sich im Vergleich von Ki-67 positiven (jeder Stärke) und Ki-67 negativen HNSCC keine signifikanten Unterschiede zwischen den G-Stadien ergaben (Abb. 30 A), konnten bezüglich der Färbeergebnis-Scores, unter Berücksichtigung des *Cut-off* Wertes für eine Überexpression von Score >3 (siehe Kapitel 4.2.4.1), signifikante Unterschiede zwischen den Differenzierungsstadien beobachtet werden (Abb. 30 B und 31): Zeigten im G1-Stadium nur 13% der Ki-67+ Proben eine relevante Überexpression, d.h. eine mäßig-starke Ki-67 Färbung (Score >3), bei gleichzeitig 88% G1 HNSCC mit schwacher Färbung, so wiesen im G2-Stadium bereits 63% der Ki-67 positiven G2 HNSCC einen Score >3 auf. Im G3-Stadium waren es sogar 71% (Abbildung 30 B und 31). Dieser Unterschied zeigte ein Signifikanzniveau von $p=0,018$.

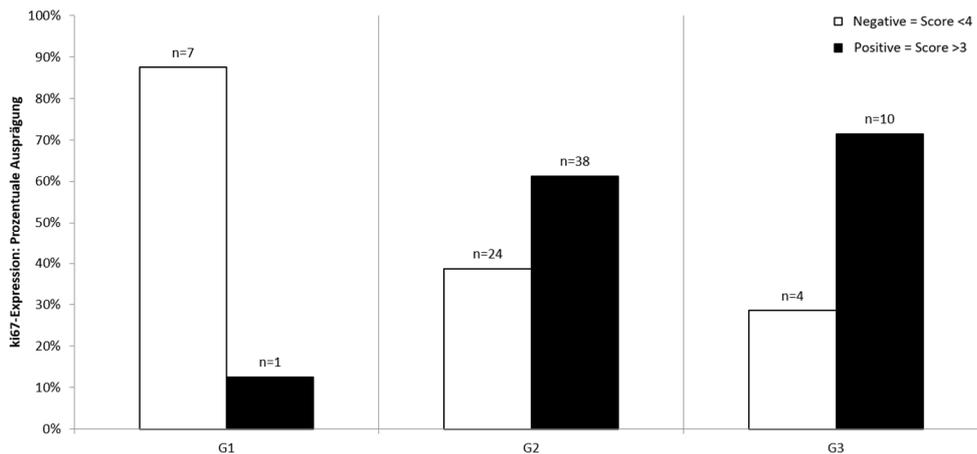


Abbildung 31. Ki-67 Score >3 vs. Score 0-3 – Korrelation mit G
Relative Expression von Ki-67 in HNSCC in Abhängigkeit vom *Grading* unter Berücksichtigung des Grenzwerts für ein positives Ergebnis von Ki-67 ab einem Score >3. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen bezüglich der Ki-67-Expression ($p=0,018$; Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher).

Unserer Daten passen zum allgemeinen Forschungs- und Wissensstand. Ki-67 ist ein etablierter Marker für hochproliferative [33, 66, 82, 84, 127, 151, 167, 169] und undifferenzierte Zellen [54, 106, 135, 183] und wird mit dem Vorliegen und Erhalt von Tumorstammzellen und deren Mikroumgebung assoziiert [51]. Passend zu diesen Eigenschaften wurde wiederholt ein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer Ki-67-Expression und einer schlechteren klinischen Prognose beschrieben [2, 54, 84, 127, 139, 167-169, 176, 183, 187, 206, 239].

In einigen Arbeiten konnte übereinstimmend mit unseren Daten ein signifikanter Zusammenhang ($p \leq 0,001$) von Ki-67-Aktivität bzw. -Expression und histologischem *Grading* festgestellt werden [54, 135]. So wurde z.B. eine Hochregulation von Ki-67 mit zunehmendem histologischem *Grading* bei SCC des Larynx (LSCC, Larynxkarzinom) beschrieben ($p < 0,001$) [183]. Auch Krecicki et al. konnten eine zunehmende Ki-67-Expression in Abhängigkeit vom Schweregrad der dysplastischen Veränderungen der Läsion beobachten, so blieb eine hohe Expression Karzinomen vorbehalten und nahm mit abnehmendem Differenzierungsgrad der Zellen zu [121]. Pastuszewski et al. konnten ebenfalls eine eindeutige Korrelation von Malignitätsgrad bzw. höherem histologischem *Grading* und Ki-67-Expression in Larynxkarzinomen feststellen [167]. Die gleiche gegenläufige Beobachtung von signifikant höherer Ki-67-Aktivität bei abnehmender Differenzierung ($p < 0,01$) machten Izawa et al. [106]. Allerdings gab es auch Arbeitsgruppen, die keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Ki-67-Expression und histologischem Grad feststellen konnten [2]. Ursächlich für diese Diskrepanz könnte sein, dass Acikalin et al. in ihrer Untersuchung G1- und G2-Tumore zusammenfassten und mit G3-Tumoren verglichen [2]. In unseren Daten wurde die stärkste Zunahme der Ki-67-Expression insbesondere zwischen

gering- und hochdifferenzierten Tumoren, aber auch zwischen gering- und mäßigdifferenzierten HNSCC nachgewiesen. Dies wurde so auch von anderen Gruppen beobachtet [114]. Gleichzeitig bestand aufgrund der Zusammenfassung von G1- und G2- Tumoren bei Acikalin et al. zwischen den untersuchten Gruppen eine ausgeprägte Diskrepanz in der Kohortengröße, mit 56 G1-2 Tumoren vs. nur 7 LSCC im G3-Stadium [2], auch dies hat Einfluss auf die statistische Aussagekraft der Daten. In allen Studien machten die G2-Tumore die größte Gruppe an untersuchten Gewebeproben aus. Dies liegt unter anderem auch daran, dass hinsichtlich der Anwendung eines histologischen Graduierungssystems bislang international kein überzeugender Konsens gefunden wurde und es an Standardisierung mangelt [15, 28, 31-32, 34], sodass einzelne Aspekte der Bewertung und die abschließende Einteilung nach Differenzierungsgrad zu einem gewissen Anteil subjektiv bleiben [22, 84, 114, 167, 191, 228]. Auch über die prognostische Aussagekraft der histologischen Graduierungssysteme besteht Uneinigkeit. Auch wenn einige Studien für die verschiedenen *Grading*-Systeme eine prognostische Aussagekraft belegen konnten [4, 16, 27, 34-35, 130, 133], stellen andere Publikationen, einschließlich der auf den klassischen Klassifikationen nach Broders basierenden WHO-Klassifikation, die klinisch-prognostische Relevanz des Graduierens in Frage [109, 113, 165, 191]. Hingegen wird der klinischen TNM Klassifikation mit die bedeutendste prognostische Aussagekraft zugesprochen [54]. Diese Aspekte führen u.a. dazu, dass konventionellen Plattenepithelkarzinomen, die nicht klar andere Kriterien erfüllen, häufig ein mittlerer Differenzierungsgrad (G2) zugeordnet wird [199].

4.2.4.5 ***Ki-67 – Expression in HNSCC und Korrelation mit klinischen Parametern – Fazit***

Ki-67 ist als Proliferationsmarker mit großer klinischer Bedeutung und Einfluss auf die Graduierung vieler menschlicher Tumore etabliert und akzeptiert [33, 66, 82, 127, 169]. Seine große prognostische Bedeutung konnte in mehreren umfangreichen Studien für verschiedene Entitäten belegt werden [139, 168, 176, 187]. Es gibt aber auch Hinweise, dass Ki-67 regulierende Funktionen im Zellzyklus übernimmt und unter anderem am Aufbau und Erhalt des Heterochromatins und der perichromosomalen Schicht mitotischer Zellen beteiligt ist [24, 59, 210, 222, 225]. Zugleich wird es selbst durch die aktuelle Zellzyklusphase in seiner Expression und Funktion reguliert [209]. Es gibt erste Daten, die postulieren, dass Ki-67 eine Rolle beim Erhalt des Mikroenvironments von Tumorstammzellen, der sogenannten Tumorstammzellnische und deren Regulation spielt, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind [84].

Ki-67 wird in allen Zellzyklusphasen stark exprimiert, die aktiv an der Zellteilung teilnehmen (G1-, S-, G2- und M-Phase). Hingegen ist es in Zellen, die in der G0-Phase ruhen, stark herunterreguliert [80-81, 183]. Diese Eigenschaften werden genutzt um durch immunhistologische Färbung auf Ki-67 die sogenannte Wachstumsfraktion (der Anteil der in der Proliferationsphase befindlichen Zellen) des Tumors, darzustellen und mit Hilfe dieser auf die vermeintliche Wachstumsgeschwindigkeit bzw. Proliferationsrate des Tumors Rückschlüsse zu ziehen [33, 151, 167]. Zur Bestimmung der eigentlichen bzw. exakten Mitoserate müssten die Mitosen pro Zeiteinheit ausgezählt werden [198], was für die klinisch-diagnostische Routine deutlich weniger praktikabel wäre. Für unsere Auswertung wurde bei Ki-67 neben der Intensität der Färbung, insbesondere die prozentuale Anzahl an Tumorzellen mit positivem Ki-67-Signal als Wert herangezogen. Ki-67 dient in der alltäglichen Praxis zudem der Entscheidungshilfe zwischen benignen, präneoplastischen und malignen Veränderungen. Eine hohe Ki-67-Expression korreliert mit zunehmender dysplastischer Veränderung und maligner Entartung [84, 121, 266]. Gioacchini et al. konnten in ihrem Review für LSCC erarbeiten, dass Ki-67 als immunhistochemischer Marker stark mit Tumorausbreitung und schlechter Prognose der Tumorpatienten korreliert [84]. Sittel et al. zeigten anhand einer prospektiven Studie an primär laserchirurgisch resezierten T1- und T2-Larynxkarzinomen, dass eine primär starke Ki-67-Expression signifikant mit Therapieversagen und Rezidiv bzw. Rekurrenz des Tumors verknüpft war [206].

Auch unsere Daten zeigten eine zunehmende Expression von Ki-67 in prognostisch ungünstigen Stadien, sowohl mit Zunahme des T-Stadiums als auch bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen sowie mit zunehmender Undifferenziertheit des Tumors. Allerdings waren unsere Beobachtungen einer vermehrten Ki-67-Expression nur bezüglich eines höheren *Grading* statistisch signifikant (siehe auch jeweilige Kapitel 4.2.4.2-4). Während andere Studiengruppen auch bezüglich des T- [2, 151] und N-Stadiums [2, 54, 135, 183] signifikante Zusammenhänge beobachten konnten.

4.2.5 p53

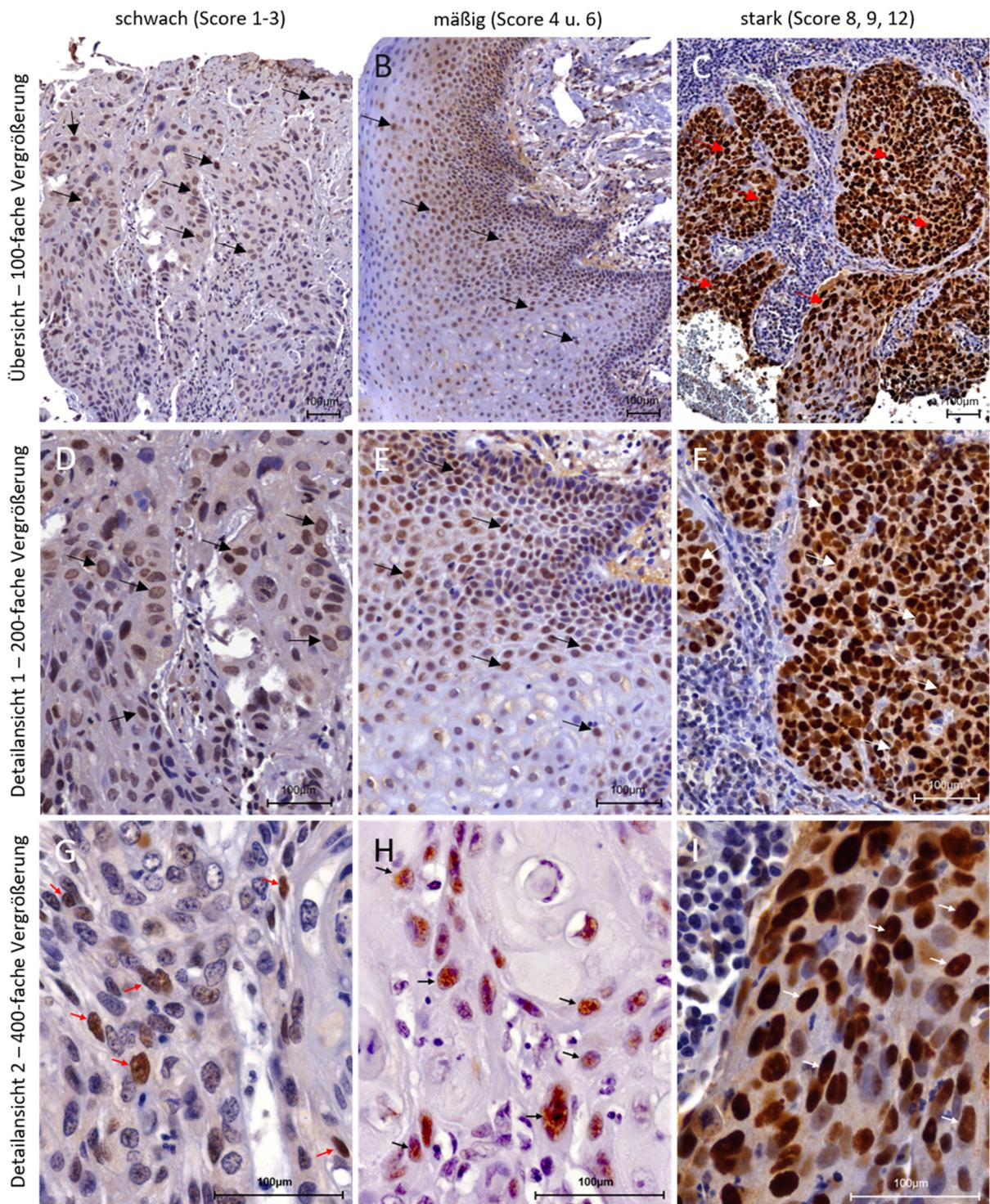


Abbildung 32. Exemplarische Übersichts- und Detail-Darstellungen der immunhistochemischen Ergebnisse für p53 an 3 Beispielen, je nach Färbeargebnis-Score bzw. Bewertungsgruppe. **A** und **D**: OPH 20, Rezidiv, 60% (+) n; **G**: OPH 6, Primarius, 10% + n; **B** und **E**: LAR 4, Primarius, 50% + n; **H**: LAR 9, Primarius, 20% ++ n; **C, F, I (starke Färbung)**: HPH 16, Primarius 90% ++ n. Die Pfeile zeigen exemplarisch auf einige der für p53 positiv angefärbten Zellkerne der Tumorzellen. (n = nukleär, HPH = Hypopharynx, LAR = Larynx, OPH = Oropharynx, (+) = schwach positiv, + = einfach positiv, ++ = zweifach positiv)

Abbildung 32 zeigt beispielhaft die immunhistochemischen Färbeargebnisse für p53 entsprechend den Bewertungsgruppen des Scores: schwache Färbung (Score 1-3),

mäßige Färbung (Score 4-6), starke Färbung (Score 8, 9, 12), in 3 Vergrößerungen. Ab einem Score von 4 lag eine deutliche Überexpression vor.

Wie in Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, spielt die nukleozytoplasmatische Lokalisation von p53 eine Rolle für die Cisplatin-Resistenz von Kopf-Halskarzinomen [141]. In einem Drittel der von uns untersuchten HNSCC konnte p53 nicht mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden, in den anderen zwei Dritteln lag p53 in 91% im Zellkern angereichert vor. Insgesamt zeigten 2% der Tumore eine sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Anfärbung. In 3 Fällen konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden. Nur eine Probe wies eine allein-zytoplasmatische p53-Anfärbung auf. Die exakten Zahlenwerte sind Tab. 21 und 22 (im tabellarischen Anhang) zu entnehmen. Die Kontrollen waren nur in 23,8% (n=5 von 16) positiv und wiesen in 100% eine nukleäre Färbung auf. Aufgrund dieser Datenlage erfolgte kein weiterer Vergleich der ABCC2- bzw. ABCG2-Expression in p53_cp vs. p53_n HNSCC.

4.2.5.1 p53 – Expression positiv/negativ

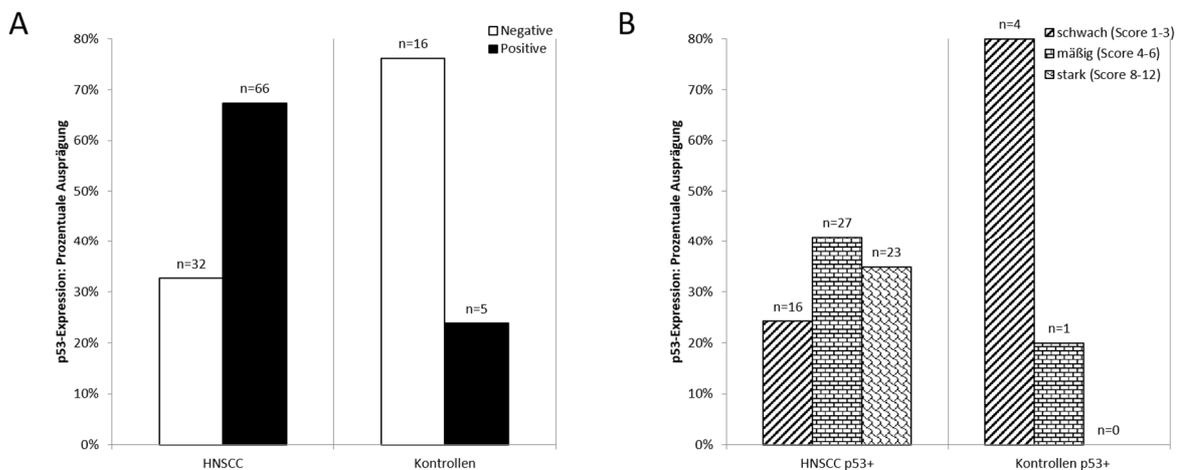


Abbildung 33. p53 Expression – HNSCC vs. Kontrollen

A: Verhältnis von p53 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der positiven Färberegebnisse für p53 in die Scoring-Gruppen: schwach, mäßig und stark. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweils p53 positiven HNSCC/Kontrollen.

Die beobachteten Unterschiede in der p53-Expression zwischen HNSCC und Kontrollen zeigten sich statistisch signifikant ($p < 0,001$; Chi-Quadrat-Test). Betrachtete man die unterschiedlichen Ausprägungen des Färberegebnisses konnten ebenfalls signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p = 0,030$; Exakter Test nach Fisher). Siehe auch Tab. 22, Anhang.

p53 war in 67% der HNSCC positiv. 51% wiesen sogar eine mindestens mäßige bis starke Expression auf. Betrachtet man nur die positiven Proben (p53+) lag der Anteil an mäßiger bis starker Expression (Score >3) bei über 2 Dritteln (76%, n=50 von 66 p53+; Abb. 33 B). Im Gegensatz hierzu waren 76% der Kontrollen ohne immunhistochemischen p53-Nachweis. Von den 24% p53+ Kontrollen wiesen 80% (n=4/5) ein schwaches Ergebnis auf (Score 1-3), nur 1 Probe bot ein mäßiges

Färbeergebnis für p53. Die beobachteten Unterschiede in der p53-Expression zwischen HNSCC und Kontrollen zeigten sich statistisch signifikant (Abb. 33).

Auch andere Arbeiten konnten in HNSCC eine vermehrte p53 Expression beobachten. Es werden Expressionswerte von in 37 bis 71% der Fälle beschrieben [19, 180]. Klatka et al. beschrieben sogar eine Expression in 90% der von ihnen untersuchten LSCC [119]. Bei fehlendem p53-Expressionsnachweis in HNSCC kann eine trunkierende disruptive *TP53*-Mutation vorliegen, die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [132].

4.2.5.2 **p53 – Expression in HNSCC und Alter**

Es konnte eine Zunahme der p53-Expression in HNSCC mit höherem Lebensalter der Patienten beobachtet werden. So lag in der ältesten Altersgruppe (>65 J.) der Anteil an mäßig bis stark p53 exprimierenden HNSCC mit 60% gegenüber den anderen Altersgruppen am höchsten (86% der p53+ HNSCC >65 J.), wobei die starke Expression anteilmäßig mit 56% (n=10/18) überwog (Abb. 52 im Anhang). Sie entsprach 48% der p53+ HNSCC dieser Altersgruppe. Allerdings zeigten sich die Unterschiede nicht als statistisch signifikant. Dies ist im Einklang mit Ashraf et al, die in Larynxkarzinomen ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation von Alter (p=0,72), Geschlecht (p=1,0) und p53-Expression feststellen konnten [19].

p53 spielt eine Rolle bei der Zellalterung (engl. *Senescence*). Walcher et al. untersuchten den Zusammenhang von Seneszenz und Stammzelleigenschaften in Tumoren. So kann Zellalterung und der mit ihr einhergehende dauerhafte Wachstumsstopp und Zellzyklus-Arrest durch Chemotherapie und/oder Radiotherapie induziert werden, indem DNA-Schäden zu einer Tumor-Suppressor-Induktion führen (p53, p21, p16). Nach einer Chemo- oder Radiotherapie überleben nicht nur Tumorstammzellen, sondern es bleiben auch einige seneszente Tumorzellen zurück. Diese werden entsprechend ihres Zytokinmusters im günstigsten Fall durch das Immunsystem erkannt und beseitigt. Bleibt letzteres jedoch aus, können sie im Verlauf selbst stammzell-ähnliche Merkmale entwickeln und pro-tumorigen wirken [190, 248].

4.2.5.3 **p53 – Expression in HNSCC und T-Stadium**

Betrachtet man die Expression von p53 in HNSCC entsprechend der T-Stadien untereinander, fällt auf, dass die Expression mit dem lokalen Progress der HNSCC zuzunehmen scheint. Je höher das T-Stadium, desto höher ist die Expression von p53. So wiesen T3-4 HNSCC mit 59% den höchsten Anteil an Tumoren mit einem Score >3 auf. Bei den T2 HNSCC lag dieser Anteil bereits bei 52%, wohingegen die T1-

HNSCC nur in 44% eine solche Überexpression zeigten. In der Kontroll-Kohorte konnte nur in 5% der Fälle eine solch hohe Expression mit Score >3 festgestellt werden. Die Subgruppe der T2 HNSCC besaß jeweils den größten Anteil an p53- und stark p53+ HNSCC von den verschiedenen T-Subgruppen (Abb. 53 im Anhang). Allerdings waren die beobachteten Unterschiede nicht statistisch signifikant.

Andere Forschergruppen konnten ebenfalls keinen statistisch belastbaren Zusammenhang zwischen p53-Expression und Tumorgroße ($p=0,39$) [19] oder T-Stadium feststellen [119, 151]. Golusinski et al. hingegen fanden eine positive Korrelation von p53-Nachweis und höherem T-Stadium ($p<0,05$). Izawa et al. beobachteten ähnlich zu unseren Ergebnissen einen tendenziell höheren Prozentsatz p53 positiver HNSCC im T3-4 Stadium gegenüber T1-2 [106].

4.2.5.4 **p53 – Expression in HNSCC und N-Stadium**

Betrachtet man die Expression von p53 entsprechend des lokalen Lymphknotenstatus, so ergibt sich kein wesentlicher Unterschied zwischen diesen beiden Subgruppen (Abb. 54 im Anhang). In beiden Gruppen zeigte sich eine vornehmlich positive p53 Expression: 65% der N0 HNSCC waren p53+ gegenüber 72% der N+ HNSCC mit positivem p53-Färbeergebnis. Der Anteil an HNSCC mit starker p53 Färbung lag bei den N+ HNSCC mit 28% gegenüber 17% in N0 HNSCC um 9% höher. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der p53-Expression in Abhängigkeit von der regionären Metastasierung.

Auch andere Studien konnten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen p53-Expression und Lymphknotenmetastasierung (N-Stadium) finden [119, 151, 196], während Golusinski et al. ($p<0,01$) [85-86], Ashraf et al. ($p=0,008$) [19], Kazkayasi et al. ($p=0,006$) [112] und weitere [37, 106] einen solchen feststellten.

4.2.5.5 **p53 – Expression in HNSCC und Grading**

Die p53-Expression in Abhängigkeit vom *Grading* ergab keine wegweisenden Ergebnisse (Abb. 55 im Anhang). Es fand sich eine mäßig stärkere Expression in G2 HNSCC gegenüber G1 HNSCC, während es in der undifferenziertesten Gruppe, den G3 HNSCC gegenüber den G1 HNSCC keinen wesentlichen Unterschied gab (Abb. 55 B im Anhang). Es schien kein direkter Zusammenhang von Undifferenziertheit des Tumors und p53-Expression in den von uns untersuchten HNSCC zu bestehen, auch statistisch konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden.

Dies ist im Einklang mit anderen Arbeiten [1, 19, 106, 119, 151]. Während andere Studien eine positive Korrelation feststellen konnten [167, 196]. Golusinski et al. [86]

konnten eine positive Korrelation zwischen p53-Expression und *Grading* beobachten ($p < 0,05$). Mondal et al. fanden eine zunehmende p53-Expression mit Zunahme des Dysplasiegrades und *Grading* bei Karzinomen [154]. Auch Kurokawa et al. fanden eine Assoziation von p53-Überexpression in Tumorrandbereichen und histologischem Grad ($p < 0,05$) [122].

4.2.5.6 **p53 – Expression in HNSCC und Korrelation mit klinischen Parametern – Fazit**

p53 ist ein nukleäres Phosphoprotein und ein Transkriptionsfaktor. Als „Wächter des Genoms“ [86, 123, 128] ist es für den Erhalt eines intakten Genoms verantwortlich [167]. Es wird in allen normalen Zellen konstitutiv exprimiert [196]. Wenn die DNA beschädigt ist, kumuliert p53 in der Zelle [170], stoppt die Replikation und ermöglicht so die Reparatur. Die Akkumulation in der Zelle ist u.a. Folge einer posttranslationalen Stabilisierung, z.B. mittels Phosphorylierung [62]. Scheitert die Reparatur, kann p53 die Apoptose auslösen und die defekte Zelle vor ihrer Vermehrung aussortieren [151, 256]. Die besondere Rolle dieses Proteins wird deutlich, wenn man beachtet, dass in ca. 50% der malignen Tumoren eine erworbene *TP53*-Mutation gefunden werden kann [62, 67]. Immunhistochemisch ist Wildtyp-p53 (WT p53) aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit (6-30 min) in der Regel mit Standardmethoden kaum detektierbar [151, 196]. p53 wird in gesunden Zellen durch mehrere Mechanismen streng reguliert [192]. Mutiertes p53 hingegen akkumuliert in der Zelle und wird auf diese Weise mittels Immunhistochemie (IHC) detektierbar, mit überwiegend nukleärer Anreicherung [167, 196]. Dem mutierten p53 fehlt es dabei an Funktionalität, was eine unkontrollierte Zellteilung erlaubt [105] und die Wahrscheinlichkeit für die Ansammlung weiterer Mutationen und die Selektion maligner Klone erhöht [123]. Eine Inaktivierung von p53 kann allerdings auch durch Bindung viraler oder körpereigener Proteine, wie dem p53 streng negativ regulierenden Protoonkogenprodukt Mdm-2 bzw. Hdm-2 ausgelöst werden [62, 67, 105, 123]. Ein Beispiel für die viral-vermittelte p53 Inaktivierung ist das E6 Protein humaner Papillomaviren 16/18 (HPV). Dieses bindet und inaktiviert WT p53 in HPV-infizierten Zellen [100] und spielt in der Tumorgenese von Zervixkarzinomen eine Rolle [20]. Die Überexpression von p53, die Hinweis auf eine Mutation des Tumorsuppressorgens und folglich einen Funktionsverlust des Proteins sein kann, wird mit einer ungünstigeren Prognose und einem aggressiveren Tumorphänotyp in HNSCC assoziiert [86, 117, 140, 167, 236, 244]. So fanden Golusinski et al. eine positive Korrelation zwischen p53-Expression und höherem T- ($p < 0,05$) und N-Stadium ($p < 0,01$) sowie *Grading* ($p < 0,05$) bei LSCC [86]. Weitere Arbeitsgruppen

kamen zu ähnlichen Ergebnissen [19, 99, 111, 117, 155, 162, 167, 207], während andere keinerlei Korrelation zwischen p53-Expression und klinisch relevanten Parametern fanden [63, 87, 119, 151, 233] oder p53 einen zuverlässigen prognostischen Wert absprachen [11, 71, 112, 170]. Einige Arbeiten konnten wiederum einen Zusammenhang von p53-Expression in HNSCC und reduzierter Chemo- und Radiosensitivität feststellen [56, 141, 208]. Auch für andere Tumorentitäten besteht Uneinigkeit über die (unabhängige) prognostische Bedeutung von p53 für das klinische *Outcome* der Patient*innen. Während einige Arbeiten eine prognostische Bedeutung für eine vermehrte p53-Expression finden konnten [55, 76, 171, 177], sprachen andere p53 einen Einfluss auf das klinische *Outcome* ab [146]. Diese Uneinigkeit sowohl in HNSCC als auch anderen Tumoren mag durch methodische Unterschiede in den Studien bedingt sein. Sie mag beispielsweise Folge kleiner und heterogener Patientenkohorten sein, vom Typ des verwendeten Gewebematerials (gefroren oder in Paraffin gebettet), von der Vorbehandlung, den verwendeten Antikörpern und den angewendeten Grenzwerten für ein positives und negatives Ergebnis abhängen oder auf falsch positive oder negative Ergebnisse zurückzuführen sein. Allerdings bedeutet ein Fehlen einer p53-Expression bzw. der Detektion mittels immunhistochemischer Methoden nicht automatisch, dass p53 nicht beeinträchtigt ist. Beispielsweise kann ein Verlust von beiden Allelen vorliegen oder die Expressionslevel unter der Detektierbarkeitsschwelle der verwendeten Antikörper liegen. Außerdem können sich z.B. disruptive *TP53*-Mutationen, die die nukleäre Translokation betreffen können, ebenfalls als negativ in der Immunhistochemie darstellen [132, 141]. Genauso bedeutet ein positives Ergebnis nicht automatisch das Vorliegen einer Mutation [105, 162]. Möchte man das Vorliegen einer Mutation beweisen oder widerlegen, muss man das Genom selbst untersuchen. Wird das Genom selbst untersucht, werden in HNSCC Mutationsraten zwischen 50-100% beschrieben [36, 194, 255]. Insbesondere in niedrig differenzierten und anaplastischen Tumoren werden diese häufig gefunden [151]. In HNSCC scheint eine Karzinogenese ohne Beteiligung von p53 eher einen geringen Anteil auszumachen [207] und sie scheint ein eher früher Schritt in der Tumorentwicklung bei HNSCC zu sein [63]. Tabakrauch wird als ein wichtiger ätiologischer Faktor für p53 Mutationen angesehen [72, 230]. Es werden höhere Expressionslevel von p53 bei Rauchern und regelmäßigem Alkoholkonsum beschrieben [71]. Insgesamt bleibt die Beziehung zwischen p53 Mutationen, immunhistochemischer Detektierbarkeit und klinischer Prognose komplex, kontrovers und noch nicht eindeutig verstanden. Eine Relevanz

von p53 Mutationen für die Karzinogenese in HNSCC und vielen anderen Tumoren ist aber unstrittig. In aktuelleren Arbeiten wird die sehr vielseitige Bedeutung von p53, die weit über die Regelung von Apoptose, Zellzyklusarrest und Seneszenz, dem permanenten Zellzyklusarrest hinaus geht, deutlich. p53 spielt demnach sowohl bei anabolen und katabolen Prozessen im Zellstoffwechsel sowie für die Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle, als auch bei Nekrose, Autophagieregulation und für den Stammzellerhalt [94]. Diese zellulären Prozesse sind sehr komplex und noch Gegenstand der Forschung. Sie betonen aber weiter die Bedeutung von p53 in der Karzinogenese und verdeutlichen seine duale Funktion, je nach Situation pro- oder antionkogen zu wirken [94].

Auch wir konnten im Großteil der HNSCC eine p53-Überexpression, als möglichen Hinweis auf stattgehabte Mutationen im Tumorsuppressorgen nachweisen und seine Relevanz in der Tumorentwicklung bei HNSCC bestätigen. p53 war in 67% der untersuchten HNSCC gegenüber der Kontrollkohorte signifikant vermehrt exprimiert. Es werden positive Expressionslevel zwischen 37 und 90% [19, 119, 180] in der Literatur beschrieben. Allerdings wiesen auch ca. ein Drittel der von uns untersuchten HNSCC ein negatives immunhistochemisches p53 Ergebnis auf. Ein negatives Ergebnis ist allerdings nicht mit dem Vorliegen eines intakten und insbesondere funktionalen p53 gleichzusetzen [105, 132, 162]. Wie Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe belegen, kann ein negatives nukleäres p53-Ergebnis ebenso prognostisch ungünstig sein und auf ein Fehlen von funktionalem p53 hindeuten [141]. Mandic et al. hatten gezeigt, dass eine vermehrte zytoplasmatische Anreicherung von mutiertem p53 mit einer erhöhten Chemotherapieresistenz assoziiert ist [141]. Lindenbergh-van der Plas und Kollegen konnten in Mund- und Oropharynxkarzinomen bei Nachweis trunkierender *TP53*-Mutationen, die zu einem kompletten Verlust der p53-Funktion führen und sich immunhistochemisch in der Regel negativ darstellen, ein signifikant reduziertes Überleben nachweisen ($p=0,008$) und auch einen Einfluss von T-Stadium, HPV-Status und Alter feststellen [132].

In der aktuell vorliegenden Studie konnten wir mit immunhistochemischer Methodik bezüglich der nukleozytoplasmatischen Lokalisation von p53 keine besonderen Erkenntnisse gewinnen. Nur in 3 der 98 Fälle zeigte sich eine zytoplasmatische p53-Anreicherung, von denen 2 zusätzlich eine nukleäre Expression aufwiesen. Aufgrund dieser niedrigen Fallzahlen und der daraus folgenden geringen Aussagekraft wurde die intrazelluläre Lokalisation von p53 und ihre mögliche klinische Relevanz in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Bezüglich der p53-Expression und den erhobenen

klinisch-prognostischen Parametern (T, N, *Grading*, Rezidiv) fanden wir keine statistisch belastbaren Korrelationen. Sodass anhand unserer Daten, unter Berücksichtigung aller Limitationen einer retrospektiven Studie, für p53 kein eindeutiger klinisch prognostischer Nutzen abgeleitet werden kann. Eine Bestimmung von p53 in Kombination mit anderen Markern, kann allerdings hilfreich sein, um einen ungünstigeren Verlauf abzuschätzen. Da in der Literatur auch eine zunehmende Expression mit Zunahme dysplastischer Veränderungen beschrieben wird, kann die Bestimmung im Rahmen von Probebiopsien einen möglichen Hinweis auf eine drohende Entartung, einschließlich der erhöhten Wahrscheinlichkeit auf die Anhäufung weiterer Mutationen geben und die betroffenen Patienten ggf. einem engermaschigeren *Follow-Up* zuführen.

4.2.6 HNSCC mit Co-Expression von Ki-67, p53 +/-, CK19, ABCC2 und ABCG2

4.2.6.1 **Vergleich von HNSCC mit Co-Expression von Ki-67, CK19, ABCG2 und ABCC2 Score 0-3 vs. Score ≥ 4**

Im Folgenden wurden zwei Subgruppen verglichen: HNSCC mit Überexpression von CK19, Ki-67 und ABCC2 und ABCG2 (mäßiger bis starker Expression, Score ≥ 4 , n=15) vs. Tumoren mit niedriger bis fehlender Expression all dieser Marker (Score 0-3, n=7). Es gab keine HNSCC-Fälle in unserem Kollektiv, die für alle Marker ein vollständig negatives Ergebnis aufwiesen. Entsprechend unserer Hypothese sollten die Tumore mit Überexpression dieser Marker die aggressiveren, mit höherer Proliferationsneigung und schlechterer Prognose abbilden und einen undifferenzierteren Phänotyp aufweisen. Die beiden Subgruppen wurden daher bezüglich der zugehörigen klinischen Parameter (T, N und *Grading*) verglichen (Abb. 34).

HNSCC mit Überexpression von Ki-67, CK19, ABCC2 und ABCG2 waren undifferenzierter (höheres *Grading*: G2/G3, 0% G1), wiesen einen fortgeschritteneren Lokalbefund (mind. T2, ebenso häufig T3-4, kaum T1) und häufiger Lymphknoten-Metastasen (N+) auf. Während die Gruppe der negativen bis gering exprimierenden Tumore ein gegensätzliches Bild ergab. Diese Tumore lagen häufiger im T1-Stadium vor, waren deutlich häufiger N0 als N+ und waren überwiegend gut differenziert (G1). Die beobachteten Unterschiede waren statistisch signifikant ($p \leq 0,05$). Hieraus lässt sich ableiten, dass die von uns verwendeten Marker, insbesondere in Kombination, das prognostisch ungünstigere Patientenkontingent herausfiltern können. All diese Marker geben Hinweise auf eine geringere Differenzierung und eher stammzelltypische Eigenschaften. Es ist anzunehmen, dass in diesen HNSCC ein größerer Anteil an

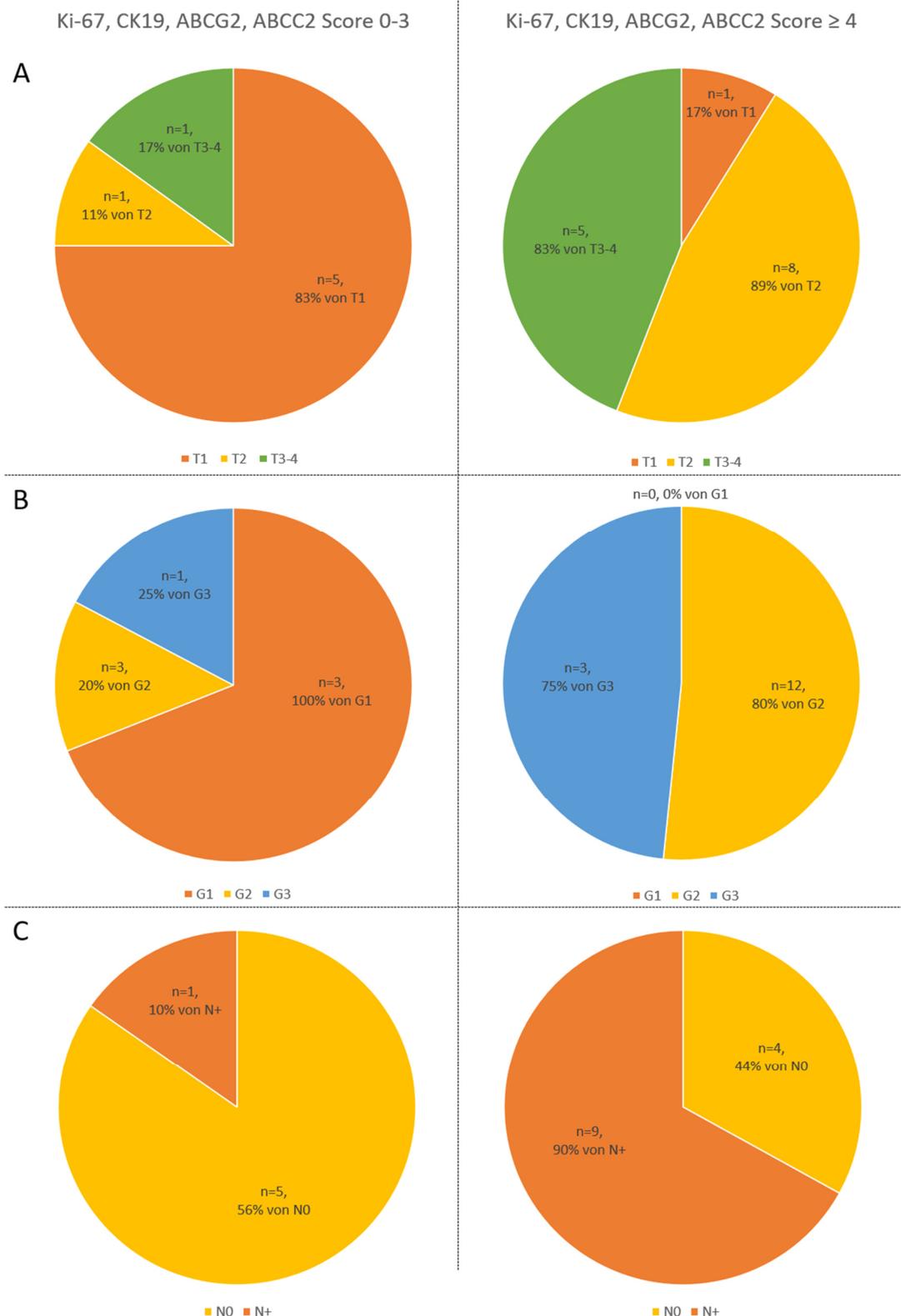


Abbildung 34. Ki-67/CK19/ABCG2/ABCC2 Score 0-3 vs. Score ≥ 4

Gegenüberstellung der Ergebnisse einer Subgruppenanalyse von HNSCC mit einem Färbeergebnisscore für Ki-67, CK19, ABCG2 und ABCC2 von 0-3 („negativ“) und einem Score ≥ 4 („Überexpression“) für dieselben Marker. Die Tortenstücke spiegeln hierbei den prozentualen Anteil der farblich markierten Subgruppen (N0 bzw. N+) von der jeweiligen Grundgesamtheit, der für alle Marker „positiven“ bzw. „negativen“ Proben wider (Spaltenprozent). Als Zahlenwerte sind die exakte Anzahl n und die relative Prozent der entsprechend der Legende farblich markierten Subgruppen pro Zeile angegeben (Bsp. in Zeile C: Anteil der „positiven“ bzw. „negativen“ Proben von N0 bzw. N+). Die beobachtbaren Unterschiede in der Expression aller Marker in Abhängigkeit vom G- und T-Stadium waren statistisch signifikant ($p < 0,05$; für T: $p = 0,017$; für G: $p = 0,011$; Exakter Test nach Fisher). Für N0 vs. N+ waren die beobachtbaren Unterschiede knapp signifikant ($p = 0,05$, Exakter Test nach Fisher).

Tumorstammzellen vorliegt und ein gesteigertes Risiko für Metastasierung und Tumorrezidiv sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bestehen. Dies ist im Einklang mit der aktuellen Studienlage, sowohl CK19 [49, 73, 131, 150, 193, 235, 242, 265] (s.a. Kapitel 4.2.3, insb. 4.2.3.5), als auch Ki-67 [2, 84, 167, 183, 206] (s.a. Kapitel 4.2.4, insb. 4.2.4.5) wurden mit geringer Differenzierung, hoher Proliferationsneigung, fortgeschrittenem Tumorstadium, Aggressivität und ungünstiger Prognose in Verbindung gebracht. ABCC2 und ABCG2 werden nicht nur in Stammzellen und Tumorstammzellen [7, 61, 64, 152, 214, 224, 234] vermehrt exprimiert, sondern werden mit Chemotherapieresistenz [23, 74, 144, 214] und schlechter klinischer Prognose [74] assoziiert (s.a. Kapitel 1.4-1.6).

4.2.6.2 **Vergleich von HNSCC mit Co-Expression aller Marker, einschließlich p53**

Im Folgenden wurde nun p53 in die Betrachtungen integriert. p53 wird wie die anderen Marker mit geringer Differenzierung, hoher Proliferationsneigung, fortgeschrittenem Tumorstadium, Aggressivität und ungünstiger Prognose assoziiert [19, 117, 154-155, 167, 196] (s. a. Kapitel 4.2.5.6). Bei Vorliegen von Punktmutationen im *TP53*-Gen kumuliert dieses im Zellkern und gibt insbesondere bei hoher Expression Hinweise auf das Vorliegen prognostisch ungünstiger Prozesse und eine maligne Entartung [86, 117, 140, 167, 236, 244]. Allerdings kann sich auch ein starkes zytoplasmatisches Signal bei Fehlen einer nukleären Färbung als besonders prognostisch ungünstig erweisen, wie u.a. Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt hatten [141], genauso wie die komplette Abwesenheit von p53 in Tumoren. Dabei ist anzumerken, dass immunhistochemische Verfahren häufig nicht in der Lage sind die niedrigen Expressionslevel in gesundem Gewebe nachzuweisen und dass sich z.B. disruptive *TP53*-Mutationen, die die nukleäre Translokation betreffen können, ebenfalls als negativ in der Immunhistochemie darstellen können [132].

Vergleich von HNSCC mit Co-Expression von Ki-67, CK19, ABCG2, ABCC2, p53 Score 0-3 vs. ≥ 4 und Ki-67, CK19, ABCG2, ABCC2 ≥ 4 und p53 Score 0-3

Schloss man p53 in die Beobachtungen ein, spaltete also die Gruppe der CK19, Ki-67 und ABCC2 und ABCG2 überexprimierenden HNSCC (Score 4-12) nach ihrem p53-Status auf (Abb. 35), ergibt sich zunächst ein ähnliches Bild wie zuvor in Abb. 34 dargestellt. Die HNSCC, die alle Marker vermehrt exprimieren (n=8) sind gegenüber denen mit fehlender bis geringer Expression (Score 0-3; n=7) seltener T1, G1 oder N0. Sie liegen häufiger in einem höheren *Grading* (G2-3) und/oder höherem T-Stadium

(T2-4) vor und haben häufiger bereits Lymphknotenmetastasen (N+). Keines der CK19, Ki-67 und ABCC2 und ABCG2 überexprimierenden HNSCC war G1, die überwiegende Zahl war G2, unabhängig vom p53-Status. Allerdings handelte es sich bei den G2-Tumoren auch um das größte Subgruppenkollektiv in Abhängigkeit vom *Grading* (s.a. Kapitel 4.1.4.4 und 4.2.4.4). Bei den gering differenzierten G3 Tumoren ergab sich kein Unterschied zwischen der für alle Marker „positiven“- und der für alle Marker „negativen“-Gruppe. Allerdings schien die Gruppe der CK19, Ki-67 und ABCC2 und ABCG2 überexprimierenden, aber bezüglich p53 negativen bzw. p53 nur gering exprimierenden HNSCC (n=7) das zuvor beschriebene Verhältnis noch zu verschärfen. Diese machten die Mehrheit der G3 Tumore aus und den Großteil der N+ HNSCC. Diese Beobachtung stützt die Annahme, dass auch das Fehlen eines p53-Nachweises mit geringerer Differenzierung und dem Vorliegen von Metastasen und somit ungünstigerer Prognose und progressiverem Tumorwachstum assoziiert sein kann. Die statistische Auswertung ergab nur für die in Abhängigkeit vom T-Stadium getroffenen Beobachtungen einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der verschiedenen Subgruppen ($p=0,044$), die übrigen Analysen ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p>0,05$), was jedoch u.a. den geringen Fallzahlen geschuldet sein kann.

Vergleich von HNSCC mit Co-Expression von Ki-67, CK19, ABCG2 und ABCC2 Score 0-3 vs. ≥ 4 und p53 +/-

Die zuvor gemachte Beobachtung, dass HNSCC mit Überexpression aller Marker, aber bei p53 negativem Ergebnis häufiger G3 oder N+ sind als HNSCC mit Überexpression aller Marker einschließlich p53, galt nicht, sofern man p53 nur nach rein positivem oder negativem Ergebnis auftrennte (Abb. 56 im Anhang): Unter diesen Bedingungen betrachtet, machten die Tumore mit mindestens mäßiger Färbung für alle Marker und positivem Ergebnis für p53 jeweils die größte Gruppe der T2, T3-4, G2, G3 und N+ HNSCC aus. Die hierzugehörigen p53 negativen HNSCC stellten jeweils die zweithäufigste Gruppe dar. Während Tumore mit einem geringen bzw. negativen Score für alle Marker und negativem Ergebnis für p53 jeweils den größten Teil der T1, G1 und N0 HNSCC ausmachten. HNSCC mit fehlendem Nachweis aller Marker waren folglich differenzierter, weniger fortgeschritten und seltener metastasiert und somit prognostisch günstiger. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von T-, N- und G-Stadium in den untersuchten Subgruppen festgestellt werden ($p>0,05$). Dies kann u.a. durch die sehr kleinen Fallzahlen bedingt sein.

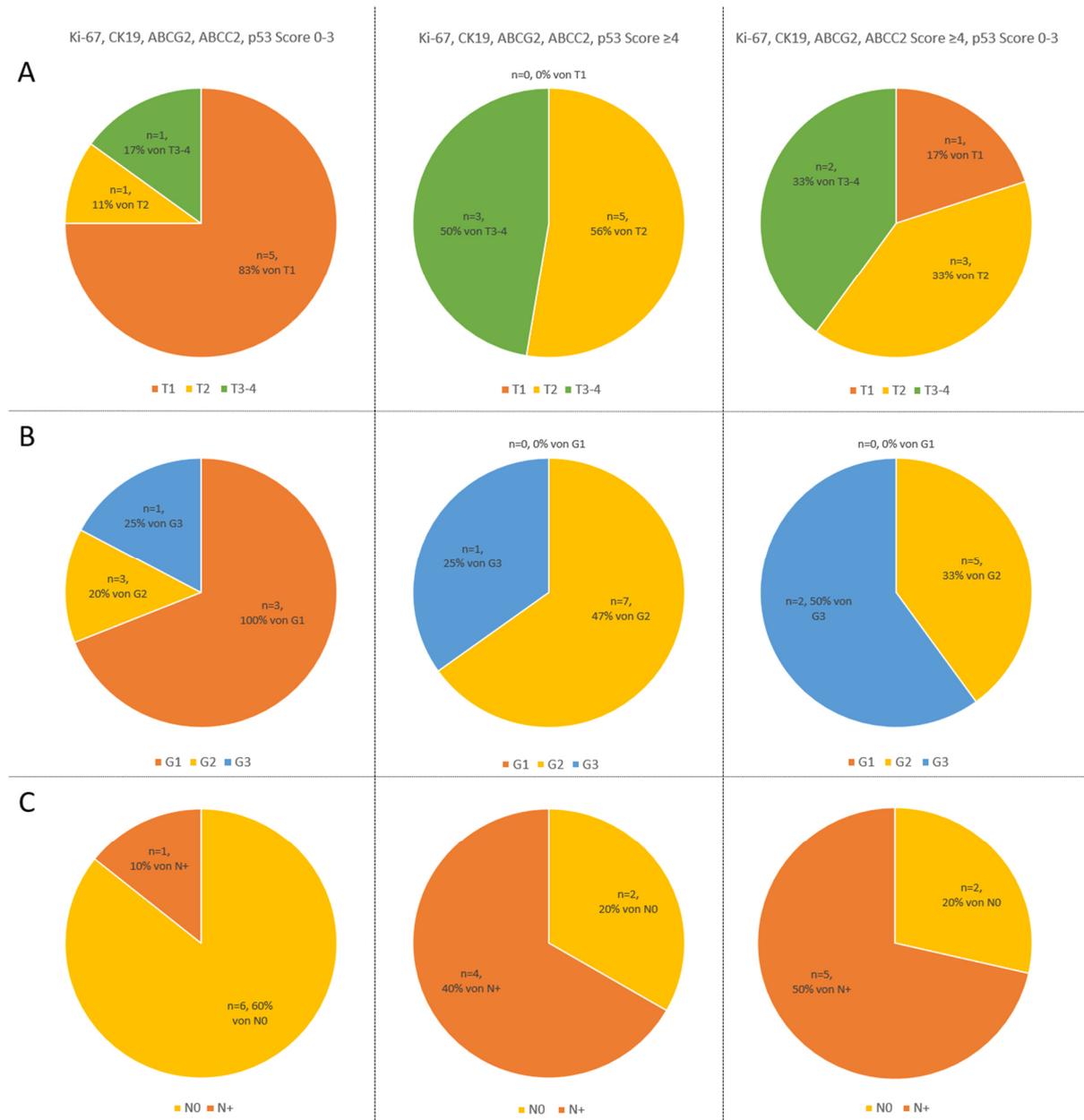


Abbildung 35. Alle Marker + p53 Score 0-3 vs. ≥ 4 vs. Ki-67/CK19/ABCG2/ABCC2 ≥ 4 /p53 Score 0-3
Gegenüberstellung der Ergebnisse dreier Subgruppenanalysen: 1. Spalte „alle negativ“ (HNSCC mit einem Färbeergebnisscore für Ki-67, CK19, ABCG2, ABCC2 und p53 von 0-3), 2. Spalte „alle positiv“ („Überexpression“ Score 4-12 für dieselben Marker), Spalte 3 „alle positiv, p53 negativ“ (Überexpression von Ki-67, CK19, ABCG2, ABCC2 (Score ≥ 4), aber p53 „negativ“ Score 0-3). Die Tortenstücke spiegeln hierbei den prozentualen Anteil der farblich markierten Subgruppen (N0 bzw. N+) von der jeweiligen Grundgesamtheit der in der Spalte angegebenen Subgruppe wider (Spaltenprozent). Als Zahlenwerte sind die exakte Anzahl n und die relativen Prozent der entsprechend der Legende farblich markierten Subgruppen pro Zeile angegeben (Bsp. in Zeile C: Anteil von N0 (gelb) bzw. N+ gesamt (orange)). Bezüglich des T-Stadiums ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede in den Untersuchten Subgruppen ($p=0,044$; Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher). Für Grading G und Lymphknotenstatus N konnten allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($G: p=0,118$, $N: p=0,106$; Exakter Test nach Fisher).

4.2.7 Vergleich Rezidiv und Primarius

4.2.7.1 Rezidiv vs. Primarius: ABCC2 Expression

Es ergaben sich keine beobachtbaren und insbesondere keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) in der ABCC2-Expression zwischen Rezidiven und Primarien (Abbildung 57 im graphischen Anhang).

4.2.7.2 Rezidiv vs. Primarius: ABCG2 Expression

Betrachtet man die Expression von ABCG2 in Primarien und Rezidiven (Abb. 58 im Anhang), so ergibt sich zunächst ein ähnliches Verhältnis von positivem und negativem ABCG2-Nachweis in der jeweiligen Gruppe. Sowohl Primarien als auch Rezidive exprimieren in der überwiegenden Anzahl ABCG2. Primarien zu 83% und Rezidive zu 95%. Dabei fällt auf, dass der Anteil an positiven Proben in der Gruppe der Rezidive mit nahezu 100% über dem relativen Anteil der positiven Proben in den Primarien liegt. Nur in einer Rezidivprobe konnte ABCG2 nicht detektiert werden. Schlüsselt man die positiven Ergebnisse entsprechend des Färbeergebnisses weiter auf, so ist bei den Primarien der Anteil an schwach exprimierenden HNSCC die größte der Subgruppen. Bei den Rezidiven waren HNSCC mit mäßiger ABCG2-Expression am stärksten vertreten. Passend hierzu lag der Anteil an mindestens mäßiggradiger Expression von ABCG2 (Score > 3) bei den Rezidiven mit 67% ($n=14/21$) über dem Anteil mäßiggradig bis stark ABCG2 exprimierender Primärtumoren (49%, $n=38/77$). Der Anteil an mäßig bis hoch exprimierenden HNSCC war bei den Rezidiven damit 1,4-mal so groß wie deren Anteil in den Primarien (Abb. 58). Allerdings zeigte sich in den Primarien häufiger eine starke Expression von ABCG2, wobei diese stark exprimierenden HNSCC insgesamt den geringsten Anteil an positiven Ergebnissen in der Kohorte ausmachten (16%, $n=16$) und dieser auf ähnlich hohem Niveau wie die Anzahl der negativen Ergebnisse lag (13%, $n=13$).

Gesamt betrachtet, konnten keine signifikanten Unterschiede in der ABCG2-Expression in Primarien und Rezidiven beobachtet werden. Allerdings unterschieden sich die untersuchten Gruppen sehr deutlich in ihrer Größe. Primärtumore waren um den Faktor 3,7 häufiger vertreten. Es ist nicht auszuschließen, dass größere Stichproben mit vergleichbareren Verhältnissen ein anderes Bild zeigen und oder sogar signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in der ABCG2-Expression aufdecken können.

4.2.7.3 *Rezidiv vs. Primarius: CK19 Expression*

Es ergab sich kein beobachtbarer und insbesondere kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der CK19-Expression zwischen Rezidiven und Primarien (Abb. 59 im graphischen Anhang).

4.2.7.4 *Rezidiv vs. Primarius: Ki-67 Expression*

Betrachtet man die Ki-67-Expression entsprechend der von uns untersuchten klinischen Marker fällt auf, dass zwischen Rezidiven und Primarien kein deutlicher Unterschied bestand (Abb. 60 im Anhang). Beide Gruppen exprimierten Ki-67 in nahezu 100% (98% der Primarien, 97% der Rezidive) und zeigten in ca 60% eine Überexpression mit einem Score >3 (Primarien 58%, Rezidive 61%). Allerdings war der Anteil an stark exprimierenden Rezidiven mit 20% etwa doppelt so hoch wie der Anteil der Primarien mit einem Score >6 (11%) (Abb. 60 B und Tab. 25 im Anhang). Auch in der statistischen Auswertung unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant hinsichtlich der Ki-67-Expression voneinander.

4.2.7.5 *Rezidiv vs. Primarius: p53 Expression*

Rezidive zeigten eine höhere Expression von p53. 57% der Rezidive wiesen eine mäßige bis starke p53-Expression auf, Primarien zeigten in 49% der Fälle eine mindestens mäßige Expression. Betrachtete man nur die p53 positiven Proben, hatten 73% der Primarien einen Score von >3 . Wohingegen bei den Rezidiven sogar 86% eine mäßige bis starke Expression zeigten (Abbildung 61 B im Anhang). Allerdings lag in den Primarien der Anteil an HNSCC mit starkem Färbeergebnis höher als in den Rezidiven. Die beobachteten Unterschiede der p53-Expression zwischen Primarien und Rezidiven waren statistisch nicht signifikant.

4.2.7.6 *Rezidiv vs. Primarius – Fazit*

Zusammenfassend konnte im Vergleich von Primarien und Rezidiven für keinen der 5 Marker ein statistisch signifikanter Unterschied gefunden werden. Es waren nur Tendenzen zu beobachten: Es schien, dass Ki-67 und p53 in Rezidiven in ausgeprägterem Maße exprimiert würden. Für die von uns besonders interessanten ABC-Transportproteine ließ sich eine solche Beobachtung ebenfalls nur als Tendenz für ABCG2 feststellen. In der ABCC2-Expression ergaben sich keine beobachtbaren Unterschiede zwischen Primärtumoren und Rezidiven.

Andere Studien fanden statistisch signifikante Korrelationen zwischen den genannten Markern und Tumorrekurrenz. Ein Zusammenhang von vermehrter Ki-67-Expression als Prädiktor einer Rekurrenz bei primär partiell-erhaltend operierten LSCC wurde von

Calgaro et al. beschrieben [38]. Sittel et al. konnten ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen Ki-67-Expression und Therapieversagen, in Form eines Tumorrezidivs belegen ($p=0,01$) [206]. Weitere Arbeitsgruppen kamen zu ähnlichen Ergebnissen [2]. Cabanillas et al. fanden eine Korrelation von Rekurrenz und immunhistochemischem p53-Nachweis [37]. Auch andere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von p53-Mutationen bzw. p53-Expression und Rezidiven bzw. Rekurrenz herstellen [230]. Zhong et al. beobachteten eine höhere Rezidivrate ($p=0,008$) in OSCC mit hoher CK19-Expression in tumorfernem Gewebe [265], konnten allerdings ähnlich zu unseren Ergebnissen im Tumorgewebe selbst keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Rekurrenz feststellen [265]. ABCC2 sprachen van den Broek et al. einen signifikanten unabhängigen prognostischen Wert bezüglich einer schlechten lokalen Krankheitskontrolle nach RCT und einer immunhistochemischen Expression zu [241]. Yanamoto et al. fanden einen signifikanten Zusammenhang von immunhistochemischem ABCG2 Nachweis und lokaler Rekurrenz bei OSCC [254].

4.2.8 Vorbehandlung mittels (Radio-) Chemotherapie

Für keinen der von uns untersuchten Marker konnten statistisch signifikante Expressionsunterschiede zwischen vorbehandelten und nicht vorbehandelten HNSCC-Proben gefunden werden (Tab. 26-30 im Anhang). Auf eine graphische Darstellung wurde verzichtet.

4.2.9 *Conclusio*

Das Ziel unserer Arbeit war die Überprüfung der Ergebnisse der Vorarbeiten mit einer Überexpression von ABCC2 und ABCG2 in (resistenten) HNSCC-Zelllinien an einer größeren Anzahl von HNSCC-Patientenproben und die Korrelation dieser mit sowohl klinischen Daten als auch weiteren mit einer schlechten Prognose assoziierten Markern, um eine mögliche klinische Bedeutung dieser Transporter in HNSCC besser abschätzen zu können. Unter anderem sollte hierbei evaluiert werden, ob, analog zu den Ergebnissen an den HNSCC-Zelllinien, resistente HNSCC-Tumore bzw. prognostisch-ungünstigere HNSCC-Tumore eine erhöhte Expression von mit einer Chemotherapieresistenz assoziierten Markern, wie ABCG2 und ABCC2, aufweisen. In der aktuellen Literatur gibt es nur wenige Untersuchungen zu ABCC2 und ABCG2 bei HNSCC, insbesondere zu ABCC2 und Cisplatinresistenz bei Kopf-Hals-Karzinomen liegen nur wenige Untersuchungen vor [229, 241], was uns in der Bearbeitung dieses Themas weiter bestärkte.

Entsprechend unserer Hypothese sollten die Tumore mit Überexpression von ABCC2, ABCG2, CK19 und Ki-67 die aggressiveren, mit höherer Proliferationsneigung und schlechterer Prognose im Kollektiv abbilden und einen undifferenzierteren Phänotyp aufweisen. Für p53 wurde das Expressionsergebnis in allen Ausprägungen mitbetrachtet. TP53-Mutationen sind mit einer ungünstigen Prognose und Chemotherapieresistenz in HNSCC assoziiert.

Unsere Hypothese konnte insofern bestätigt werden, dass HNSCC mit gemeinsamer Überexpression von Ki-67, CK19, ABCC2 und ABCG2 undifferenzierter ($\geq G2$) waren, einen fortgeschritteneren Lokalbefund ($\geq T2$) und häufiger Lymphknoten-Metastasen (N+) aufwiesen ($p \leq 0,05$). Auch HNSCC mit Expression aller 5 Marker, einschließlich p53 waren häufiger G2-3 und häufiger N+, allerdings ohne eindeutige statistische Signifikanz. Lediglich für eine gemeinsame Überexpression aller Marker einschließlich p53 (Score 4-12) und fortgeschrittenerem Lokalbefund T ($\geq T2$), fand sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass insbesondere die Kombination der von uns verwendeten Marker eine prognostisch ungünstigere Patientengruppe herausfiltern kann. HNSCC mit kombinierter Expression von CK19, Ki-67, p53 und den ABC-Transportern ABCC2 und ABCG2 tragen möglicherweise einen größeren Anteil an Tumorstammzellen in sich, in Verbindung mit einem gesteigerten Risiko für Metastasierung und Tumorrekurrenz und sind resistenter gegenüber einer Radio-/Chemotherapie. Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, um diese Beobachtungen zu validieren.

Bezieht man die Auswertungen für die einzelnen Marker aus Kapitel 4.2.1 - 4.2.5 mit ein, konnte nur für CK19 und Ki-67 ein signifikanter Zusammenhang mit dem *Grading* und für CK19 zusätzlich mit T- und N-Status gefunden werden. ABCG2, ABCC2 und p53 wurden zwar ebenfalls vermehrt und in signifikantem Ausmaß in HNSCC gegenüber dem Kontroll-Kollektiv exprimiert, allerdings ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezogen auf *Grading*, Lokalisation, Geschlecht, Alter sowie T- oder N-Status. Keiner der untersuchten Marker wies eine statistisch signifikante, unterschiedliche Expression in Rezidiven und Primarien auf, ebenso ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen mittels (Radio-)Chemotherapie vorbehandelten HNSCC-Proben und solchen ohne Vortherapie.

In einigen Fällen fanden sich beobachtbare Tendenzen, die sich möglicherweise in größeren, homogeneren Kollektiven als statistisch relevant bestätigen werden. So fanden sich solche statistisch nicht zu stützenden Tendenzen für eine vermehrte ABCC2- und ABCG2-Expression in Abhängigkeit von Undifferenziertheit, Lymphknotenmetastasierung (nur ABCG2), Rezidiv (nur ABCG2) und fortgeschrittenerem Lokalbefund. Für p53 konnten tendenzielle Zusammenhänge von vermehrter Expression und T- und N-Stadium sowie Rezidiven gefunden werden. Auch Ki-67 war tendenziell in Rezidiven etwas höher exprimiert als in Primarien. Es sind weitere möglichst prospektive Untersuchungen an größeren Studiengruppen erforderlich, um diese Tendenzen genauer zu untersuchen und sie ggf. statistisch untermauern zu können.

Abschließend kann am ehesten CK19, aber auch Ki-67 eine isolierte prognostische Relevanz zugesprochen werden, während für die von uns untersuchten ABC-Transporter dahingehend keine statistisch belastbaren Daten gewonnen werden konnten. Sowohl Ki-67 als auch CK19 dienen als Marker hochproliferativer Zellen mit Assoziation zu einem undifferenzierten [49, 242], stammzell-ähnlichen Phänotyp [131, 150]. Während CK19 allgemein als Marker epithelialer Stammzellen und Tumorstammzellen gilt [125, 228], wurde von Cidado et al. 2016 postuliert, dass auch Ki-67 in die Regulierung und den Erhalt der Tumorstammzellnische involviert ist [51]. Für beide Marker wurde wiederholt eine prognostische Relevanz für HNSCC belegt. Sie werden mit einem aggressiveren, hoch-proliferativen Tumortyp und schlechterer Prognose assoziiert [73, 193, 235, 265].

Wurde die ABCC2-Expression in CK19+ und Ki-67+ HNSCC und Kontrollen untersucht, fiel auf, dass eine Co-Expression von ABCC2 und CK19 oder ABCC2 und Ki-67 hauptsächlich HNSCC vorbehalten blieb. Die ABCC2-Expression unterschied

sich signifikant von der in CK19 oder Ki-67 positiven Kontrollen. Allerdings ergaben sich bezüglich des Vergleichs von CK19, Ki-67 oder p53 positiven und negativen HNSCC keine signifikanten Unterschiede in der ABCC2-Expression. Hierbei kann es eine Rolle spielen, dass sich für diese Vergleiche teilweise sehr geringe Fallzahlen in den Subgruppen ergaben. Für ABCG2 machten wir ähnliche Beobachtungen. ABCG2 wurde ebenfalls vermehrt in CK19+ HNSCC, Ki-67+ HNSCC sowie p53+ HNSCC gegenüber der Kontrollgruppe exprimiert. Zwischen CK19+ und CK19- HNSCC, Ki-67+ und Ki-67- HNSCC sowie p53+ und p53- HNSCC wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden. Sowohl p53+ als auch p53- HNSCC zeigten eine Überexpression von ABCG2 gegenüber der Kontrollkohorte. Die Expression der Marker schien sich nicht gegenseitig zu beeinflussen.

Alle Marker wurden in HNSCC vs. Kontrollen signifikant häufiger und stärker exprimiert. Eine relevante Co-Expression schien HNSCC vorbehalten zu bleiben.

Nicht alle initial gestellten Fragen konnten mithilfe unserer Daten beantwortet werden. Aufgrund des retrospektiven Vorgehens bestanden bezüglich einiger Parameter Datenlücken. Für die Risikofaktoren Rauchen, Alkoholkonsum und HPV-Nachweis lag eine unzureichende Datenqualität vor. Nur 12 der untersuchten 98 HNSCC waren vorbehandelt. Das Kollektiv war insgesamt, aufgrund der vielen verschiedenen erfassten Parameter sehr heterogen, sodass sich für viele Betrachtungen keine statistisch belastbaren Fallzahlen ergaben. In Bezug auf Alter und Lokalisation lag zusätzlich ein unzureichendes *Matching* von Kontrollen und Tumorproben vor. Prospektive Parameter wie Ansprechen auf die Therapie und Überleben, die ein entsprechendes *Follow-Up* erfordern, konnten nicht erhoben werden, sodass nur indirekte Rückschlüsse auf den potenziellen klinischen Verlauf anhand etablierter prognostischer Marker wie der TNM-Klassifikation gezogen werden konnten. Bezüglich der nukleozytoplasmatischen Lokalisation und ihrer Bedeutung für Prognose und Resistenz konnten mit der von uns angewandten immunhistochemischen, aber praxisnahen Methodik keine Aussagen getroffen werden. Die rein immunhistochemische Methodik der vorliegenden Arbeit ist eine weitere Schwäche, stützt sich allerdings auf eigene und intensive multi-methodische Vorarbeiten der Arbeitsgruppe. Die Nutzung nicht-parametrischer Daten, die sich aus der Methodik ergab, stellt einen weiteren Nachteil dar. Scoring-Systeme dienen hierbei der statistischen Auswertbarkeit, indem sie die diversen Teil-Ergebnisse zusammenfassen und strukturieren. Sie sollten, wie in dieser Arbeit angewandt, Farbintensität und Prozentsatz positiver Zellen berücksichtigen. Eine Gruppierung

führt aber auch dazu, dass Werte aus Grenzbereichen, der einen oder anderen Gruppe zugeordnet werden, was zu einer Über- oder Unterbewertung einer Probe führen kann.

Unter Berücksichtigung dieser üblichen und erwartbaren Limitationen einer retrospektiven Studie sowie der angewandten Methodik konnte unser Ziel dennoch erreicht werden. ABCC2 und ABCG2 konnten immunhistochemisch in der überwiegenden Anzahl von HNSCC nachgewiesen werden. Es wurde eine signifikante Überexpression beider Marker in HNSCC gegenüber der Kontrollkohorte festgestellt, was die Relevanz dieser ABC-Transporter in der Tumorgenese von HNSCC bekräftigt. Sie werden in HNSCC häufig gemeinsam mit anderen Markern für Undifferenziertheit und einen progenitor- oder stammzell-ähnlichen Zellphänotyp, hohe Tumor-Proliferationsneigung und Aggressivität, wie CK19 und Ki-67 (über)exprimiert. Diese Co-Expression blieb HNSCC vorbehalten und deutet vage auf das Vorliegen eines CSC-Tumorgenese-Modells in HNSCC hin. Insbesondere eine Co-Expression von CK19, Ki-67, ABCC2 und ABCG2, aber auch p53 scheint hilfreiche Informationen über die Tumoraggressivität und einen ungünstigen Krankheitsverlauf mit prognostischer Bedeutung zu liefern. Eine begleitende Färbung dieser Marker in der pathologischen Routine bei Diagnosestellung ist gut in den klinischen Alltag zu integrieren und könnte helfen, eine genauere prognostisch relevante Einteilung der Tumoren zu erreichen. Auf diese Weise könnte bereits bei Erstdiagnose ein Patientenkollektiv mit Bedarf für eine aggressivere Therapie und eine engmaschigere Nachsorge selektiert werden. Allerdings sind Rückschlüsse auf einen klinischen *Impact* aufgrund der bereits genannten Limitationen der vorliegenden Arbeit nur mit Vorsicht zu betrachten. Zur Validierung der von uns gemachten Beobachtungen und Hypothesen sind prospektive Studien mit längerfristigem *Follow-up* an größeren, homogeneren Kollektiven in Kombination mit genetischen Analysen erforderlich, welche diese Marker genauer gemeinsam mit klinischen-prognostischen Parametern untersuchen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches (*head and neck squamous cell carcinomas, HNSCC*) betrug im Jahre 2018 weltweit ca. 830.000 Fälle (ohne Hautkarzinome), wobei die Mortalität im gleichen Zeitraum bei ca. 444.000 lag. Ursächlich für diese seit Jahren im Wesentlichen unveränderte Sterblichkeit sind Tumorresistenzmechanismen, welche z.B. die Wirksamkeit einer Radio-Chemotherapie herabsetzen.

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich im Rahmen von Genanalysen eine erhöhte Expression der ABC (*ATP-Binding Cassette*) Transporter ABCG2 und ABCC2 in Cisplatin (CDDP) resistenten HNSCC Zelllinien verglichen mit CDDP empfindlichen Zelllinien. Diese Überexpression konnte im Folgenden für die beobachtete CDDP Resistenz mitverantwortlich gemacht werden. Das Ziel der vorliegenden weiterführenden Arbeit war es daher, im Rahmen einer immunhistochemischen retrospektiven Untersuchung die Expression dieser ABC Transporter in Geweben von HNSCC Tumorpatienten zu untersuchen. Neben ABCC2 und ABCG2 wurden hierbei auch der Proliferationsmarker Ki-67 sowie CK19 (Zytokeratin 19), welches auch als Stammzellmarker dient, eingesetzt. Darüber hinaus wurde bei den Untersuchungen auch das Tumorsuppressorprotein p53 miteingeschlossen, da die zuvor untersuchten CDDP-resistenten HNSCC Zelllinien mit hoher ABC Transporter Expression C-Terminal trunkierende *TP53* Mutationen mit zytoplasmatischer Sequestration sowie als deren Folge häufig eine begleitende Verminderung der p53-Expression aufwiesen. Die immunhistochemische Expression der genannten 5 Markerproteine ABCC2, ABCG2, Ki-67, CK19, p53 wurde im Weiteren miteinander sowie mit zur Verfügung stehenden klinischen Angaben korreliert und mittels Kontingenztabellenanalyse auf signifikante Assoziationen überprüft.

Für die durchgeführten Untersuchungen konnten Präparate von n=98 Patient*innen (Männer: n=84; Frauen: n=14) eingeschlossen werden. 10 der HNSCC stammten aus dem Bereich der Mundhöhle, 41 aus dem Pharynx und 47 aus dem Larynx. In 21 Fällen handelte es sich um Rezidive.

Alle 5 Markerproteine wurden in HNSCC gegenüber dem Kontrollkollektiv signifikant überexprimiert ($p < 0,05$). Die ABC-Transporter-Expression zeigte sich hierbei unabhängig von der Expression der übrigen Marker. In Bezug auf die klinischen Daten konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der ABCC2, ABCG2 und p53

Expression festgestellt werden. Für Ki-67 und CK19 konnte eine statistisch signifikante Korrelation von zunehmender Expression und Undifferenziertheit des Tumors gefunden werden (CK19: $p=0,013$; Ki-67: $p=0,018$). Zusätzlich wurde CK19 in HNSCC mit zunehmendem T-Stadium ($p=0,021$) sowie HNSCC mit Lymphknotenmetastasierung ($p=0,049$) signifikant vermehrt exprimiert. Eine Kombination der 4 Marker ABCC2, ABCG2, Ki-67 und CK19 ergab Hinweise auf ein prognostisch ungünstiges Patientenkollektiv. HNSCC mit gemeinsamer Überexpression dieser 4 Marker waren undifferenzierter ($\geq G2$; $p=0,017$), wiesen einen fortgeschritteneren Lokalbefund ($\geq T2$; $p=0,011$) und häufiger Lymphknoten-Metastasen (N+; $p=0,05$) auf. Schloss man p53 in die kombinierte Korrelationsuntersuchung ein, ergab sich ein weniger klares Bild, ohne eindeutigen statistischen Zusammenhang.

Neben der Schwäche einer rein immunhistochemischen Methodik, lagen in dieser Arbeit die bekannten Limitationen einer retrospektiven Studie (Daten aus 2007-2011) vor. Nicht alle Parameter konnten in erforderlicher Güte den vorliegenden Patientenunterlagen entnommen werden, sodass insbesondere in Bezug auf die Risikofaktoren Rauchen, Alkoholkonsum und HPV-Status keine Aussage möglich war. Aufgrund dieser in Teilen unzureichenden Datenqualität wurde nicht nach HPV stratifiziert. Eine weitere Schwäche war ein unzureichendes *Matching* von Kontrollen und Tumoren in Bezug auf Alter und Lokalisation. Die Nutzung nicht-parametrischer Daten stellt einen weiteren Nachteil dar. Score-Systeme ermöglichen hierbei eine Auswertbarkeit und sollten, wie in dieser Arbeit, Farbtintensität und Prozentsatz positiver Zellen berücksichtigen. Eine Gruppierung führt aber auch dazu, dass Werte aus Grenzbereichen der einen oder anderen Gruppe zugeordnet werden, was zu einer Über- oder Unterbewertung einer Probe führen kann.

Unter Berücksichtigung der genannten Limitationen lässt sich schlussfolgern, dass insbesondere eine kombinierte immunhistochemische Bestimmung von ABCG2, ABCC2, Ki-67 und CK19 im Rahmen der initialen Diagnosestellung hilfreich sein kann, um ein prognostisch besonders ungünstiges HNSCC-Patientenkollektiv herauszufiltern. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen vermehrter ABCC2 bzw. ABCG2-Expression und fortgeschritteneren Tumorstadien ergab sich nicht. Zur weiteren Evaluierung der Bedeutung von ABCG2 und ABCC2 für die Chemotherapieresistenz in HNSCC bedarf es weiterer prospektiver Studien an größeren, homogeneren Kollektiven in Kombination mit genetischen Analysen.

6 SUMMARY

The worldwide incidence of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) was 830.000 cases in 2018, with a mortality of 444.000 cases in the same year. Mechanisms of tumor resistance, such as the resistance to radio- and chemotherapy, are thought to cause this poor prognosis.

In previous studies by our group, genetic analysis found an increased expression of the ABC (ATP-Binding Cassette) transporters ABCG2 and ABCC2 in cisplatin (CDDP) resistant HNSCC cell lines compared to cisplatin sensitive cell lines.

We were able to show that the observed overexpression contributes to resistance in the CDDP resistant cell lines. In addition, the CDDP resistant cell lines also showed truncating mutations in the C-terminal region of the tumor suppressor *TP53*, leading to cytoplasmatic sequestration and lower protein expression (p53).

Based on these findings, this retrospective study investigates the expression of ABC transporters in HNSCC patient samples by immunohistochemistry (IHC). Along with ABCC2 and ABCG2, the expression of the proliferation marker Ki-67, the stem cell marker cytokeratin 19 (CK19) and p53 were examined in HNSCC samples and controls. The immunohistochemical expression levels of these 5 marker proteins were subsequently correlated with each other and with available clinical data of the patients and checked for significant associations by contingency table analysis.

The study cohort consisted of 98 patients (male: 84; female: 14). Of those, 10 HNSCC samples were obtained from the mouth, 41 from the pharynx, and 47 from the larynx. 21 samples were acquired from recurrent cases.

This study found that all five markers were significantly overexpressed in HNSCC ($p < 0.05$), and that ABC transporter expression was independent of the expression of the other markers. There was no correlation between the expression of ABCC2, ABCG2, and p53 and the clinical data. However, the expression of the markers Ki-67 ($p=0.013$) and CK19 ($p=0.018$) were significantly higher in less differentiated tumors. Furthermore, Marker CK19 was also significantly higher expressed in patients with higher T-state ($p=0.021$) and lymph node metastasis ($p=0.049$). Combined overexpression of markers ABCC2, ABCG2, Ki-67, and CK19 points towards poor prognosis: less differentiated tumors ($\geq G2$, $p=0.017$), progressed tumor growth ($\geq T2$, $p=0.011$), as well as lymph node metastasis (N+, $p=0.05$). There was no statistical significance when including p53 into the analysis.

Limitations of this study were the retrospective design (data from 2007 - 2011) and immunohistochemistry (IHC) being the only method used. Not all parameters could be obtained in the required quality from the available patient records. For example, data about tobacco smoking, alcohol consumption, and information about HPV infection were missing. Thus, no stratification was carried out according to HPV and no meaningful conclusions regarding these parameters could be drawn. The matching of controls and tumors in terms of age and location was insufficient.

The use of non-parametric data represents a disadvantage. Score systems enable and ease evaluations and should, as in this work, consider the color intensity and percentage of positive cells. However, grouping also means that values from border areas are assigned to one or the other group, which can lead to an overestimation or underestimation of a sample.

Taking the mentioned limitations into account, it can be concluded that a combined immunohistochemical staining of ABCG2, ABCC2, Ki-67 and CK19 in the early diagnosis of HNSCC can be helpful in filtering out high-risk patients with an unfavorable prognosis. However, there was no clear correlation between increased ABCC2 and ABCG2 expression and more advanced tumor stages.

Additional prospective studies on larger, more homogeneous collectives in combination with genetic analysis are required to further evaluate the role of ABCG2 and ABCC2 for chemotherapy resistance in HNSCC.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Abbas, N., Labib El-Sharkawy, S., Abbas, E., & Abdel Monem El-Shaer, M. (März 2007). Immunohistochemical study of p53 and angiogenesis in benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103(3), S. 385-390. doi:10.1016/j.tripleo.2005.11.008
- [2] Acikalın, M., Oner, U., Tel, N., Paşaoğlu, O., Caklı, H., & Colak, E. (August 2004). Prognostic significance of Ki-67 expression for patients with laryngeal squamous cell carcinoma primarily treated by total laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 261(7), S. 376-380. doi:10.1007/s00405-003-0699-3. Epub 2003 Nov 6. PMID: 14605812
- [3] Ailles, L., & Prince, M. (2009). Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Methods Mol Biol*, 568, S. 175-193. doi:10.1007/978-1-59745-280-9_11
- [4] Akhter, M., Hossain, S., Rahman, Q., & Molla, M. (Mai 2011). A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. *Oral Maxillofac Pathol*, 15(2), S. 168-176. doi:10.4103/0973-029X.84485
- [5] Al-Hajj, M., & Clarke, M. (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, 23(43), S. 7274-7282. doi:10.1038/sj.onc.1207947
- [6] Al-Hajj, M., Becker, M., Wicha, M., Weissman, I., & Clarke, M. (2004). Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 14(1), S. 43-47. doi:10.1016/j.gde.2003.11.007
- [7] Al-Hajj, M., Wicha, M., Benito-Hernandez, A., Morrison, S., & Clarke, M. (1. April 2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(7), S. 3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- [8] Alkomyfan, K., Wiegand, S., Müller, H., Windfuhr, J., Werner, J., & Sesterhenn, A. (Juni 2010). Cyfra 21-1 as a tumor marker for follow-up of patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Anticancer Res*, 30(6), S. 2291-2296. PMID: 20651382
- [9] Allegra, E., & Trapasso, S. (21. November 2012). Cancer stem cells in head and neck cancer. *Onco Targets Ther*, 5, S. 375-383. doi:10.2147/OTT.S38694
- [10] Allegra, E., Lombardo, N., La Boria, A., Rotundo, G., Bianco, M. R., Barrera, T., Cuccunato, M., & Garozzo, A. (November 2011). Quality of voice evaluation in patients treated by supracricoid laryngectomy and modified supracricoid laryngectomy. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 145(5), S. 789-795. doi:10.1177/0194599811416438
- [11] Almangush, A., Heikkinen, I., Mäkitie, A., Coletta, R., Läärä, E., Leivo, I., & Salo, T. (5. September 2017). Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*, 117(6), S. 856-866. doi:10.1038/bjc.2017.244 Epub 2017 Jul 27. PMID: 28751758; PMCID: PMC5589992
- [12] Al-Shagahin, H., Alkomyfan, K., Müller, H., Sesterhenn, A., & Werner, J. (August 2009). Cyfra 21-1 as a serum tumor marker for follow-up of patients with laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 29(8), S. 3421-3425. PMID: 19661367
- [13] Amin, M., Edge, S., Greene, F., Byrd, D., Brookland, R., Washington, M., Gershenwald, J., Compton, C., Hess, K., Sullivan, D., Jessup, J., Brierley, J., Gaspar, L., Schilsky, R., Balch, C., Winchester, D., Asare, E., Madera,

- M., Gress, D., Meyer, L. (2017). *AJCC Cancer Staging Manual - Eighth Edition* (8. Ausg.). New York: Springer-Verlag.
- [14] An, Y., Kiang, A., Lopez, J., Kuo, S., Yu, M., Abhold, E., Chen, J., Wang-Rodriguez, J., & Ongkeko, W. (2012). Cigarette smoke promotes drug resistance and expansion of cancer stem cell-like side population. *PLoS One*, 7(11), e47919. doi:10.1371/journal.pone.0047919
- [15] Anneroth, G., Hansen, L., & Silverman, S. J. (März 1986). Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. *J Oral Pathol*, 15(3), S. 162-168. doi:10.1111/j.1600-0714.1986.tb00599.x. PMID: 3084741
- [16] Arduino, P., Carrozzo, M., Chiecchio, A., Broccoletti, R., Tirone, F., Borra, E., Bertolusso, G., & Gandolfo, S. (August 2008). Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases. *J Oral Maxillofac Surg*, 66(8), S. 1570-1579. doi:10.1016/j.joms.2007.12.024. PMID: 18634942
- [17] Argiris, A., Karamouzis, M., Raben, D., & Ferris, R. (2008). Head and neck cancer. *Lancet*, 371(9625), S. 1695-1709. doi:10.1016/S0140-6736(08)60728-X. PMID: 18486742
- [18] Armstrong, D., Bundy, B., Wenzel, L., Huang, H., Baergen, R., Lele, S., Copeland, L., Walker, J., Burger, R., & Gynecologic Oncology Group (2006). Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 354(1), S. 34-43. doi:10.1056/NEJMoa052985
- [19] Ashraf, M., Maghbul, M., Azarpira, N., & Khademi, B. (Oktober-Dezember 2010). Expression of Ki67 and P53 in primary squamous cell carcinoma of the larynx. *Indian J Pathol Microbiol*, 53(4), S. 661-665. doi:10.4103/0377-4929.72019. PMID: 21045388
- [20] Asiaf, A., Ahmad, S., Mohammad, S., & Zargar, M. (Mai 2014). Review of the current knowledge on the epidemiology, pathogenesis, and prevention of human papillomavirus infection. *Eur J Cancer Prev*, 23(3), S. 206-224. doi:10.1097/CEJ.0b013e328364f273. PMID: 24129107
- [21] Barak, V., Meirovitz, A., Leibovici, V., Rachmut, J., Peretz, T., Eliashar, R., & Gross, M. (Oktober 2015). The Diagnostic and Prognostic Value of Tumor Markers (CEA, SCC, CYFRA 21-1, TPS) in Head and Neck Cancer Patients. *Anticancer Res*, 35(10), S. 5519-5524. PMID: 26408719
- [22] Blackwell, K., Fu, Y., & Calcaterra, T. (15. Januar 1995). Laryngeal dysplasia. A clinicopathologic study. *Cancer*, 75(2), S. 457-463. doi:10.1002/1097-0142(19950115)75:2<457::aid-cnrcr2820750208>3.0.co;2-9. PMID: 7812916
- [23] Bleau, A., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E., Huse, J., Brennan, C., & Holland, E. (6. März 2009). PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell*, 4(3), S. 226-235. doi:10.1016/j.stem.2009.01.007
- [24] Booth, D., Takagi, M., Sanchez-Pulido, L., Petfalski, E., Vargiu, G., Samejima, K., Imamoto, N., Ponting, C., Tollervey, D., Earnshaw, W., & Vagnarelli, P. (27. Mai 2014). Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *eLife*, 3, e01641. doi:10.7554/eLife.01641. PMID: 24867636; PMCID: PMC4032110
- [25] Bosch, F., Ouhayoun, J., Bader, B., Collin, C., Grund, C., Lee, I., & Franke, W. (1989). Extensive changes in cytokeratin expression patterns in pathologically affected human gingiva. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 58(1), S. 59-77. doi:10.1007/BF02890059. PMID: 2480686.

- [26] Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., & Kirchner, T. (2005). Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 5(9), S. 744-749. doi:10.1038/nrc1694. PMID: 16148886
- [27] Brandwein-Gensler, M., Smith, R., Wang, B., Penner, C., Theilken, A., Broughel, D., Schiff, B., Owen, R., Smith, J., Sarta, C., Hebert, T., Nason, R., Ramer, M., DeLacure, M., Hirsch, D., Myssiorek, D., Heller, K., Prystowsky, M., Schlecht, N., & Negassa, A. (Mai 2010). Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 34(5), S. 676-688. doi:10.1097/PAS.0b013e3181d95c37. PMID: 20414102
- [28] Brandwein-Gensler, M., Teixeira, M., Lewis, C., Lee, B., Rolnitzky, L., Hille, J., Genden, E., Urken, M., & Wang, B. (Februar 2005). Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol*, 29(2), S. 167-178. doi:10.1097/01.pas.0000149687.90710.21. PMID: 15644773
- [29] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA CANCER J CLIN*, 68(6), S. 394-424. doi:10.3322/caac.21492 Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593
- [30] Brechbuhl, H., Gould, N., Kachadourian, R., Riekhof, W., Voelker, D., & Day, B. (28. Mai 2010). Glutathione transport is a unique function of the ATP-binding cassette protein ABCG2. *J Biol Chem*, 285(22), S. 16582-16587. doi:10.1074/jbc.M109.090506. Epub 2010 Mar 23. PMID: 20332504; PMCID: PMC2878084.
- [31] Broders, A. (1920). Squamous cell cancer of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. *Journal of the American Medical Association*, 74, S. 656-664.
- [32] Broders, A. (1941). The microscopic grading of cancer. *Surg Clin North Am*, 21, S. 947-962.
- [33] Brown, D., & Gatter, K. (Dezember 1990). Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, 17(6), S. 489-503. doi:10.1111/j.1365-2559.1990.tb00788.x. PMID: 2076881
- [34] Bryne, M., Koppang, H., Lilleng, R., & Kjaerheim, A. (April 1992). Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*, 166(4), S. 375-381. doi:10.1002/path.1711660409. PMID: 1517891
- [35] Bryne, M., Koppang, H., Lilleng, R., Stene, T., Bang, G., & Dabelsteen, E. (September 1989). New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*, 18(8), S. 432-437. doi:10.1111/j.1600-0714.1989.tb01339.x. PMID: 2607465
- [36] Caamano, J., Zhang, S., Rosvold, E., Bauer, B., & Klein-Szanto, A. (April 1993). p53 alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines. *Am J Pathol*, 142(4), S. 1131-1139. PMID: 7682763; PMCID: PMC1886889
- [37] Cabanillas, R., Rodrigo, J., Astudillo, A., Domínguez, F., Suárez, C., & Chiara, M. (1. Mai 2007). P53 expression in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx and its lymph node metastases: new results for an old question. *Cancer*, 109(9), S. 1791-1798. doi:10.1002/cncr.22646. PMID: 17380529.

- [38] Calgaro, N., Marioni, G., Blandamura, S., Giacomelli, L., Stramare, R., Bertolin, A., Staffieri, A., & de Filippis, C. (April 2007). P27 and MIB-1 expression is related to malignancy recurrence in laryngeal carcinoma treated with partial laryngectomy: preliminary results. *J Otolaryngol*, *36*(2), S. 98-105. doi:10.2310/7070.2007.0004. PMID: 17459280
- [39] Carvalho, A., Nishimoto, I., Califano, J., & Kowalski, L. (1. Mai 2005). Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*, *114*(5), S. 806-816. doi:10.1002/ijc.20740. PMID: 15609302.
- [40] Céruse, P., Rabilloud, M., Charrié, A., Dubreuil, C., & Disant, F. (Oktober 2005). Study of cyfra 21-1, a tumor marker, in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, *114*(10), S. 768-776. doi:10.1177/000348940511401006. PMID: 16285267
- [41] Chen, H., & Kuo, M. (2010). Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs*, *2010*, S. 430939. doi:10.1155/2010/430939. Epub 2010 Sep 14. PMID: 20885916; PMCID: PMC2946579.
- [42] Chen, Y., Chen, Y., Hsu, H., Tseng, L., Huang, P., Lu, K., Chen, D., Tai, L., Yung, M., Chang, S., Ku, H., Chiou, S., & Lo, W. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, *385*(3), S. 307-313. doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.048. Epub 2009 May 18. PMID: 19450560.
- [43] Chen, Z., & Tiwari, A. (2011). Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *The FEBS Journal*, *278*(18), S. 3226-3245. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08235.x
- [44] Chen, Z., Kawabe, T., Ono, M., Aoki, S., Sumizawa, T., Furukawa, T., Uchiumi, T., Wada, M., Kuwano, M., & Akiyama, S. (1999). Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Mol Pharmacol*, *56*(6), 1219-1228. doi:10.1124/mol.56.6.1219. PMID: 10570049.
- [45] Cheng, G., & To, K. (2012). Adverse Cell Culture Conditions Mimicking the Tumor Microenvironment Upregulate ABCG2 to Mediate Multidrug Resistance and a More Malignant Phenotype. *ISRN Oncol*, *2012*, S. 746025. doi:10.5402/2012/746025. Epub 2012 Jun 14. PMID: 22778999; PMCID: PMC3384895.
- [46] Chenn, A., & Walsh, C. (Juli 2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*, *297*(5580), S. 365-369. doi:10.1126/science.1074192. PMID: 12130776.
- [47] Cho, R., & Clarke, M. (Februar 2008). Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, *18*(1), S. 48-53. doi:10.1016/j.gde.2008.01.017. Epub 2008 Mar 19. PMID: 18356041.
- [48] Choy, H. (Juli 2006). Satraplatin: an orally available platinum analog for the treatment of cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, *6*(7), S. 973-982. doi:10.1586/14737140.6.7.973. PMID: 16831070.
- [49] Chu, P., & Weiss, L. (Mai 2002). Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*, *40*(5), S. 403-439. doi:10.1046/j.1365-2559.2002.01387.x. PMID: 12010363.
- [50] Chu, X., Strauss, J., Mariano, M., Li, J., Newton, D., Cai, X., Wang, R., Yabut, J., Hartley, D., Evans, D., & Evers, R. (Mai 2006). Characterization of mice lacking the multidrug resistance protein MRP2 (ABCC2). *J Pharmacol Exp Ther*, *317*(2), S. 579-589. doi:10.1124/jpet.105.098665. Epub 2006 Jan 18. PMID: 16421286.

- [51] Cidado, J., Wong, H., Rosen, D., Cimino-Mathews, A., Garay, J., Fessler, A., Rasheed, Z., Hicks, J., Cochran, R., Croessmann, S., Zabransky, D., Mohseni, M., Beaver, J., Chu, D., Cravero, K., Christenson, E., Medford, A., Mattox, A., De Marzo, A., Argani, P., Chawla, A., Hurley, P., Lauring, J., & Park, B. (2. Februar 2016). Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. *Oncotarget*, 7(5), S. 6281-6293. doi:10.18632/oncotarget.7057. PMID: 26823390; PMCID: PMC4868756
- [52] Cole, S., Sparks, K., Fraser, K., Loe, D., Grant, C., Wilson, G., & Deeley, R. (1994). Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Research*, 54(22), S. 5902-5910. PMID: 7954421.
- [53] Collins, A., Berry, P., Hyde, C., Stower, M., & Maitland, N. (Dezember 2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.*, 65(23), S. 10946-10951. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018. PMID: 16322242.
- [54] Cordes, C., Münzel, A., Rudolph, P., Hoffmann, M., Leuschner, I., & Gottschlich, S. (April 2009). Immunohistochemical staining of Ki-67 using the monoclonal antibody Ki-s11 is a prognostic indicator for laryngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 29(4), S. 1459-1465. PMID: 19414402
- [55] Cordone, I., Masi, S., Mauro, F., Soddu, S., Morsilli, O., Valentini, T., Vegna, M., Guglielmi, C., Mancini, F., Giuliacci, S., Sacchi, A., Mandelli, F., & Foa, R. (1. Juni 1998). p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood*, 91(11), S. 4342-4349. PMID: 9596683
- [56] Couture, C., Raybaud-Diogenè, H., Têtu, B., Bairati, I., Murry, D., Allard, J., & Fortin, A. (1. Februar 2002). p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer*, 94(3), S. 713-722. doi:10.1002/cncr.10232. PMID: 11857304
- [57] Curado, M., & Boyle, P. (2013). Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol. *Curr Opin Oncol.*, 25(3), S. 229–234.
- [58] Curley, M., Therrien, V., Cummings, C., Sergent, P., Koulouris, C., Friel, A., Roberts, D., Seiden, M., Scadden, D., Rueda, B., & Foster, R. (Dezember 2009). CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells*, 27(12), S. 2875-2883. doi:10.1002/stem.236. PMID: 19816957.
- [59] Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A., Müller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A., & Gerlich, D. (14. Juli 2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*, 535(7611), S. 308-312. doi:10.1038/nature18610. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27362226; PMCID: PMC4947524
- [60] Dalerba, P., Dylla, S., Park, I., Liu, R., Wang, X., Cho, R., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E., Simeone, D., Shelton, A., Parmiani, G., Castelli, C., & Clarke, M. (Juni 2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(24), S. 10158-10163. doi:10.1073/pnas.0703478104. Epub 2007 Jun 4. PMID: 17548814; PMCID: PMC1891215.
- [61] Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (April 2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 5(4), S. 275-284. doi:10.1038/nrc1590. PMID: 15803154.
- [62] Dey, A., Verma, C., & Lane, D. (15. Januar 2008). Updates on p53: modulation of p53 degradation as a therapeutic approach. *Br J Cancer*,

- 98(1), S. 4-8. doi:10.1038/sj.bjc.6604098. Epub 2008 Jan, PMID: 18182973; PMCID: PMC2359710
- [63] Dolcetti, R., Doglioni, C., Maestro, R., Gasparotto, D., Barzan, L., Pastore, A., Romanelli, M., & Boiocchi, M. (9. September 1992). p53 over-expression is an early event in the development of human squamous-cell carcinoma of the larynx: genetic and prognostic implications. *Int J Cancer*, 52(2), S. 178-182. doi:10.1002/ijc.2910520204. PMID: 1521906
- [64] Donnenberg, V., & Donnenberg, A. (August 2005). Multiple drug resistance in cancer revisited: The cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol*, 45(8), S. 872-877. doi:10.1177/0091270005276905. PMID: 16027397.
- [65] Doweck, I., Barak, M., Uri, N., & Greenberg, E. (Dezember 2000). The prognostic value of the tumour marker Cyfra 21-1 in carcinoma of head and neck and its role in early detection of recurrent disease. *Br J Cancer*, 83(12), S. 1696-1701. doi:10.1054/bjoc.2000.1502. PMID: 11104568; PMCID: PMC2363457
- [66] Dowsett, M., Nielsen, T., A'Hern, R., Bartlett, J., Coombes, R., Cuzick, J., Ellis, M., Henry, N., Hugh, J., Lively, T., McShane, L., Paik, S., Penault-Llorca, F., Prudkin, L., Regan, M., Salter, J., Sotiriou, C., Smith, I., Viale, G., Zujewski, J., & Hayes, D. (16. November 2011). Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*, 103(22), S. 1656-1664. doi:10.1093/jnci/djr393. Epub 2011 Sep 29. PMID: 21960707; PMCID: PMC3216967
- [67] Duffy, M., Synnott, N., & Crown, J. (September 2017). Mutant p53 as a target for cancer treatment. *Eur J Cancer*, 83, S. 258-265. doi:10.1016/j.ejca.2017.06.023. Epub 2017 Jul 28. PMID: 28756138
- [68] Eckardt, J., Bentsion, D., Lipatov, O., Polyakov, I., Mackintosh, F., Karlin, D., Baker, G., & Breitz, H. (20. April 2009). Phase II study of picoplatin as second-line therapy for patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 27(12), S. 2046-2051. doi:10.1200/JCO.2008.19.3235. Epub 2009 Mar 16. PMID: 19289620.
- [69] Edge, S., Byrd, D., Compton, C., Fritz, A., Greene, F., & Trotti, A. (2010). *AJCC cancer staging manual. 7th ed.* New York: Springer-Verlag.
- [70] Elferink, M., Olinga, P., Draaisma, A., Merema, M., Faber, K., Slooff, M., Meijer, D., & Groothuis, G. (November 2004). LPS-induced downregulation of MRP2 and BSEP in human liver is due to a posttranscriptional process. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287(5), S. G1008-1016. doi:10.1152/ajpgi.00071.2004. Epub 2004 Jun 17. PMID: 15205115.
- [71] Farshadpour, F., Hordijk, G., Koole, R., & Slootweg, P. (Oktober 2008). Head and neck squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients with multiple tumors: etiologic significance of p53 and Ki-67 in non-tumorous epithelium. *J Oral Pathol Med*, 37(9), S. 549-554. doi:10.1111/j.1600-0714.2008.00657.x. Epub 2008 Mar 3. PMID: 18331287
- [72] Field, J., Spandidos, D., Malliri, A., Gosney, J., Yiagnisis, M., & Stell, P. (September 1991). Elevated P53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer*, 64(3), S. 573-577. doi:10.1038/bjc.1991.352. PMID: 1911200; PMCID: PMC1977652.
- [73] Fillies, T., Werkmeister, R., Packeisen, J., Brandt, B., Morin, P., Weingart, D., Joos, U., & Buerger, H. (13. Jan 2006). Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer*, 6, S. 10. doi:10.1186/1471-2407-6-10. PMID: 16412231; PMCID: PMC1379654.

- [74] Fletcher, J., Haber, M., Henderson, M., & Norris, M. (Februar 2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer*, 10(2), S. 147-156. doi:10.1038/nrc2789. Epub 2010 Jan 15. PMID: 20075923.
- [75] Fradette, J., Germain, L., Seshaiyah, P., & Coulombe, P. (25. Dezember 1998). The type I keratin 19 possesses distinct and context-dependent assembly properties. *J Biol Chem*, 273(52), S. 35176-35184. doi:10.1074/jbc.273.52.35176. PMID: 9857055
- [76] Fujino, M., Dosaka-Akita, H., Harada, M., Hiroumi, H., Kinoshita, I., Akie, K., & Kawakami, Y. (15. Dezember 1995). Prognostic significance of p53 and ras p21 expression in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 76(12), S. 2457-2463. doi:10.1002/1097-0142(19951215)76:12<2457::aid-cncr2820761209>3.0.co;2-x. PMID: 8625071
- [77] Galanski, M. (Juni 2006). Recent developments in the field of anticancer platinum complexes. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 1(2), S. 285-295. doi:10.2174/157489206777442287. PMID: 18221042.
- [78] Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., & Kroemer, G. (12. April 2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), S. 1869-1883. doi:10.1038/onc.2011.384. Epub 2011 Sep 5. PMID: 21892204.
- [79] Gehrt, F., Rudhart, S., Geisthoff, U., Birk, R., Stuck, B., Hoch, S., & Thangavelu, K. (2020). Stellenwert des Tumormarkers CYFRA 21-1 im Rahmen der Behandlung fortgeschrittener Larynx- / Hypopharynxkarzinome. *Laryngorhinootologie*, 99(S 02), S. 93-94. doi:10.1055/s-0040-1711591
- [80] Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H., Schwab, U., & Stein, H. (Oktober 1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133(4), S. 1710-1715. PMID: 6206131
- [81] Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., & Stein, H. (15. Januar 1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31(1), S. 13-20. doi:10.1002/ijc.2910310104. PMID: 6339421
- [82] Gerdes, J., Stein, H., Pileri, S., Rivano, M., Gobbi, M., Ralfkiaer, E., Nielsen, K., Pallesen, G., Bartels, H., Palestro, G., & Delsol, G. (22. August 1987). Prognostic relevance of tumour-cell growth fraction in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet*, 2(8556), S. 448-449. doi:10.1016/S0140-6736(87)90977-9. Erratum in: *Lancet* 1987 Sep 26;2(8561):756. PMID: 2887743.
- [83] Gillison, M., Koch, W., Capone, R., Spafford, M., Westra, W., Wu, L., Zahurak, M., Daniel, R., Viglione, M., Symer, D., Shah, K., & Sidransky, D. (3. Mai 2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 92(9), S. 709–720. doi:10.1093/jnci/92.9.709. PMID: 10793107.
- [84] Gioacchini, F., Alicandri-Ciuffelli, M., Magliulo, G., Rubini, C., Presutti, L., & Re, M. (Juli 2015). The clinical relevance of Ki-67 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 272(7), S. 1569-1576. doi:10.1007/s00405-014-3117-0. Epub 2014 Jun 3. PMID: 24890978
- [85] Golusiński, W., Olofsson, J., Szmeja, Z., & Majewski, P. (1996). p53, PCNA and Ki67 in laryngeal cancer. *Polish Journal of Pathology: Official Journal of the Polish Society of Pathologists*, 47(4), S. 175-182. PMID: 9097709.
- [86] Golusinski, W., Olofsson, J., Szmeja, Z., Szyfter, K., Szyfter, W., Biczysko, W., & Hemminki, K. (1997). Alteration of p53 gene structure and function in

- laryngeal squamous cell cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 254 Suppl 1, S. 133-137. doi:10.1007/BF02439744. PMID: 9065648
- [87] Gonzalez-Moles, M., Galindo, P., Gutierrez-Fernandez, J., Sanchez-Fernandez, E., Rodriguez-Archilla, A., Ruiz-Avila, I., & Bravo, M. (Juli-August 2001). P53 protein expression in oral squamous cell carcinoma. survival analysis. *Anticancer Res*, 21(4B), S. 2889-2894. PMID: 11712782
- [88] Goodell, M., Brose, K., Paradis, G., Conner, A., & Mulligan, R. (1. April 1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 183(4), S. 1797-1806. doi:10.1084/jem.183.4.1797. PMID: 8666936; PMCID: PMC2192511.
- [89] Graziano, A., d'Aquino, R., Tirino, V., Desiderio, V., Rossi, A., & Pirozzi, G. (Februar 2008). The stem cell hypothesis in head and neck cancer. *J Cell Biochem*, 103(2), S. 408-412. doi:10.1002/jcb.21436. PMID: 17546610.
- [90] Green, D., & Kroemer, G. (30. April 2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458(7242), S. 1127-1130. doi:10.1038/nature07986. PMID: 19407794; PMCID: PMC2814168.
- [91] Greene, F., Page, D., Fleming, I., Fritz, A., Balch, C., Haller, D., & Morrow, M. (2002). *AJCC Cancer Staging Manual, 6th Edition*. New York: Springer-Verlag.
- [92] Gupta, G., Nguyen, D., Chiang, A., Bos, P., Kim, J., Nadal, C., Gomis, R., Manova-Todorova, K., & Massagué, J. (12. April 2007). Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*, 446(7137), S. 765-770. doi: 10.1038/nature05760. PMID: 17429393.
- [93] Gupta, P., Chaffer, C., & Weinberg, R. (September 2009). Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med*, 15(9), S. 1010-1012. doi:10.1038/nm0909-1010. Epub 2009 Sep 4. PMID: 19734877.
- [94] Hager, K., & Gu, W. (April 2014). Understanding the non-canonical pathways involved in p53-mediated tumor suppression. *Carcinogenesis*, 35(4), S. 740-746. doi:10.1093/carcin/bgt487. Epub 2013 Dec 31. PMID: 24381013; PMCID: PMC3977149
- [95] Hall, M., Okabe, M., Shen, D., Liang, X., & Gottesman, M. (2008). The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48, S. 495-535. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.080907.180426. PMID: 17937596.
- [96] Hamaguchi, K., Godwin, A., Yakushiji, M., O'Dwyer, P., Ozols, R., & Hamilton, T. (1. Nov 1993). Cross-resistance to diverse drugs is associated with primary cisplatin resistance in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.*, 53(21), S. 5225-5232. PMID: 8106143.
- [97] Hanahan, D., & Weinberg, R. (4. März 2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), S. 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.
- [98] Hartmann, G., Cheung, A., & Piquette-Miller, M. (Oktober 2002). Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia. *J Pharmacol Exp Ther*, 303(1), S. 273-281. doi:10.1124/jpet.102.039404. PMID: 12235261.
- [99] Hashmi, A., Hussain, Z., Hashmi, S., Irfan, M., Khan, E., Faridi, N., Khan, A., & Edhi, M. (3. Juli 2018). Immunohistochemical over expression of p53 in head and neck Squamous cell carcinoma: clinical and prognostic significance. *BMC Res Notes*, 11(1), S. 433. doi:10.1186/s13104-018-3547-7. PMID: 29970180; PMCID: PMC6029369
- [100] Hengstermann, A., Linares, L., Ciechanover, A., Whitaker, N., & Scheffner, M. (30. Januar 2001). Complete switch from Mdm2 to human

- papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(3), S. 1218-1223. doi:10.1073/pnas.031470698. Epub 2001 Jan 23. PMID: 11158620; PMCID: PMC14735.
- [101] Hermann, P., Huber, S., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J., Guba, M., Bruns, C., & Heeschen, C. (September 2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3), S. 313-323. doi:10.1016/j.stem.2007.06.002. PMID: 18371365.
- [102] Hoch, S., Rudhart, S., Stuck, B., & Birk, R. (April 2018). Stellenwert des Tumormarkers CYFRA 21 – 1 zur Beurteilung der regionären und distanten Tumorkontrolle fortgeschrittener Oropharynxkarzinome. *Laryngo-Rhino-Otol*, 97. doi:10.1055/s-0038-1640044
- [103] Holdenrieder, S., Wehnl, B., Hettwer, K., Simon, K., Uhlig, S., & Dayyani, F. (11. April 2017). Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*, 116(8), S. 1037-1045. doi:10.1038/bjc.2017.45. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28278517; PMCID: PMC5396105
- [104] Hu, C., Li, H., Li, J., Zhu, Z., Yin, S., Hao, X., Yao, M., Zheng, S., & Gu, J. (Dezember 2008). Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling. *Carcinogenesis*, 29(12), S. 2289-2297. doi:10.1093/carcin/bgn223. Epub 2008 Sep 26. PMID: 18820285.
- [105] Ishida, H., Irie, K., Itoh, T., Furukawa, T., & Tokunaga, O. (15. September 1997). The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer*, 80(6), S. 1034-1045. PMID: 9305703
- [106] Izawa, H., Yonemitsu, N., Shin, T., & Sugihara, H. (Juli 1999). Histopathological analysis of apoptosis, and expression of p53, bcl-2, bax, and Ki-67 in laryngeal squamous cell carcinomas and dysplasia. *Auris Nasus Larynx*, 26(3), S. 317-330. doi:10.1016/s0385-8146(99)00005-x. PMID: 10419041
- [107] Jedlitschky, G., Hoffmann, U., & Kroemer, H. (Juni 2006). Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2(3), S. 351-366. doi:10.1517/17425255.2.3.351. PMID: 16863439.
- [108] Jemal, A., Bray, F., Center, M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (März - April 2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2), S. 69-90. doi:10.3322/caac.20107. Epub 2011 Feb 4. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):134. PMID: 21296855.
- [109] Johnson, N., Franceschi, S., Ferlay, J., Ramadas, K., Schmid, S., MacDonald, D., Bouquot, J., & Sloatweg, P. (2005). Squamous cell carcinoma. In L. Barnes, J. Eveson, P. Reichart, & D. Sidransky (Hrsg.), *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours* (S. 168-175). Lyon: IARC Press.
- [110] Kanzaki, A., Toi, M., Nakayama, K., Bando, H., Mutoh, M., Uchida, T., Fukumoto, M., & Takebayashi, Y. (April 2001). Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 92(4), S. 452-458. doi:10.1111/j.1349-7006.2001.tb01115.x. PMID: 11346468; PMCID: PMC5926724.
- [111] Karpathiou, G., Monaya, A., Forest, F., Froudarakis, M., Casteillo, F., Marc Dumollard, J., Prades, J., & Peoc'h, M. (Juni 2016). p16 and p53

- expression status in head and neck squamous cell carcinoma: a correlation with histological, histoprognostic and clinical parameters. *Pathology*, 48(4), S. 341-348. doi:10.1016/j.pathol.2016.01.005. Epub 2016 Apr 23. PMID: 27113547
- [112] Kazkayasi, M., Hücümenoğlu, S., Siriner, G., & Hücümenoğlu, M. (September 2001). Over-expression of p53 and c-erbB-2 oncoproteins in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 258(7), S. 329-335. doi:10.1007/s004050100346. PMID: 11699821
- [113] Kearsley, J., & Thomas, S. (August 1993). Prognostic markers in cancers of the head and neck region. *Anticancer Drugs*, 4(4), S. 419-429. doi:10.1097/00001813-199308000-00001. PMID: 8400343
- [114] Kearsley, J., Furlong, K., Cooke, R., & Waters, M. (Juni 1990). An immunohistochemical assessment of cellular proliferation markers in head and neck squamous cell cancers. *Br J Cancer*, 61(6), S. 821-827. doi:10.1038/bjc.1990.184. PMID: 2372483; PMCID: PMC1971683
- [115] Kelland, L. (August 2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 7(8), S. 573-584. doi:10.1038/nrc2167. Epub 2007 Jul 12. PMID: 17625587.
- [116] Kellokoski, J., Syrjänen, S., Tosi, P., Cintonino, M., Leoncini, P., & Syrjänen, K. (Januar 1991). Cytokeratin pattern in normal and HPV infected oral mucosa in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol Med*, 20(1), S. 26-31. doi:10.1111/j.1600-0714.1991.tb00883.x. PMID: 1705981.
- [117] Khan, H., Gupta, S., Husain, N., Misra, S., Mps, N., Jamal, N., & Ghatak, A. (21. November 2014). Correlation between expressions of Cyclin-D1, EGFR and p53 with chemoradiation response in patients of locally advanced oral squamous cell carcinoma. *BBA Clin*, 3, S. 11-17. doi:10.1016/j.bbacli.2014.11.004. PMID: 26675419; PMCID: PMC4661497
- [118] Kirkman, T. (1996). *Statistics to Use*. (Kirkman, T.W.) Abgerufen am 25-31. 5 2020 von <http://www.physics.csbsju.edu/stats/>
- [119] Klatka, J. (Dezember 2001). Prognostic value of the expression of p53 and bcl-2 in patients with laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 258(10), S. 537-541. doi:10.1007/s004050100383. PMID: 11829192
- [120] Köberle, B., Tomicic, M., Usanova, S., & Kaina, B. (Dezember 2010). Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*, 1806(2), S. 172–182. doi:10.1016/j.bbcan.2010.07.004. Epub 2010 Jul 17. PMID: 20647037.
- [121] Krecicki, T., Jeleń, M., Zalesska-Krecicka, M., Rak, J., Szkudlarek, T., & Jeleń-Krzeszewska, J. (März 1999). Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions. *Oral Oncol*, 35(2), S. 180-186. doi:10.1016/s1368-8375(98)00100-6. PMID: 10435153
- [122] Kurokawa, H., Zhang, M., Matsumoto, S., Yamashita, Y., Tanaka, T., Tomoyose, T., Takano, H., Funaki, K., Fukuyama, H., Takahashi, T., & Sakoda, S. (November 2005). The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 34(10), S. 602-607. doi:10.1111/j.1600-0714.2005.00358.x. PMID: 16202080
- [123] Lane, D. (2. Juli 1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), S. 15-16. doi:10.1038/358015a0. PMID: 1614522
- [124] Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M., & Dick, J. (Februar 1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation

- into SCID mice. *Nature*, 367(6464), S. 645-648. doi:10.1038/367645a0. PMID: 7509044.
- [125] Larouche, D., Hayward, C., Cuffley, K., & Germain, L. (2005). Keratin 19 as a stem cell marker in vivo and in vitro. In *Methods Mol Biol.* (Bd. 289, S. 103-110). doi:10.1385/1-59259-830-7:103. PMID: 15502175
- [126] Lebwohl, D., & Canetta, R. (September 1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer*, 34(10), S. 1522–1534. doi:10.1016/s0959-8049(98)00224-x. PMID: 9893623.
- [127] Leong, A., Sormunen, R., Vinyuvat, S., Hamdani, R., & Suthipintawong, C. (Mai 2001). Biologic markers in ductal carcinoma in situ and concurrent infiltrating carcinoma. A comparison of eight contemporary grading systems. *Am J Clin Pathol*, 115(5), S. 709-718. doi:10.1309/wbu9-22qn-c3na-2q12. PMID: 11345835
- [128] Levine, A., Momand, J., & Finlay, C. (6. Juni 1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351(6326), S. 453-456. doi:10.1038/351453a0. PMID: 2046748
- [129] Li, C., Heidt, D., Dalerba, P., Burant, C., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M., & Simeone, D. (Februar 2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.*, 67(3), S. 1030-1037. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030. PMID: 17283135.
- [130] Li, Y., Bai, S., Carroll, W., Dayan, D., Dort, J., Heller, K., Jour, G., Lau, H., Penner, C., Prystowsky, M., Rosenthal, E., Schlecht, N., Smith, R., Urken, M., Vered, M., Wang, B., Wenig, B., Negassa, A., & Brandwein-Gensler, M. (September 2013). Validation of the risk model: high-risk classification and tumor pattern of invasion predict outcome for patients with low-stage oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*, 7(3), S. 211-223. doi:10.1007/s12105-012-0412-1. Epub 2012 Dec 19. PMID: 23250819; PMCID: PMC3738758
- [131] Lindberg, K., & Rheinwald, J. (Januar 1989). Suprabasal 40 kd keratin (K19) expression as an immunohistologic marker of premalignancy in oral epithelium. *Am J Pathol.*, 134(1), S. 89–98. PMID: 2464285; PMCID: PMC1879556.
- [132] Lindenbergh-van der Plas, M., Brakenhoff, R., Kuik, D., Buijze, M., Bloemena, E., Snijders, P., Leemans, C., & Braakhuis, B. (1. Juni 2011). Prognostic significance of truncating TP53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 17(11), S. 3733-3741. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0183. Epub 2011 Apr 5. PMID: 21467160
- [133] Lindenblatt, Rde C., Martinez, G., Silva, L., Faria, P., Camisasca, D., & Lourenço, Sde Q. (Januar 2012). Oral squamous cell carcinoma grading systems--analysis of the best survival predictor. *J Oral Pathol Med*, 41(1), S. 34-39. doi:10.1111/j.1600-0714.2011.01068.x. Epub 2011 Sep 8. PMID: 21902722
- [134] Listl, S., Jansen, L., Stenzinger, A., Freier, K., Emrich, K., Holleczeck, B., Katalinic, A., Gondos, A., Brenner, H., & GEKID Cancer Survival Working Group. (2013). Survival of patients with oral cavity cancer in Germany. *PLoS One*, 8(1), e53415. doi:10.1371/journal.pone.0053415. Epub 2013 Jan 18. PMID: 23349710; PMCID: PMC3548847.
- [135] Liu, M., Lawson, G., Delos, M., Jamart, J., Ide, C., Coche, E., Weynand, B., Desuter, G., Hamoir, M., Remacle, M., & Marbaix, E. (April 2003). Predictive value of the fraction of cancer cells immunolabeled for proliferating cell nuclear antigen or Ki67 in biopsies of head and neck carcinomas to identify lymph node metastasis: comparison with clinical and

- radiologic examinations. *Head Neck*, 25(4), S. 280-288.
doi:10.1002/hed.10218. PMID: 12658732
- [136] Lo, W., Kao, S., Chi, L., Wong, Y., & Chang, R. (Juli 2003). Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg*, 61(7), S. 751-758.
doi:10.1016/s0278-2391(03)00149-6. PMID: 12856245.
- [137] Lobo, N., Shimono, Y., Qian, D., & Clarke, M. (2007). The Biology of Cancer Stem Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, S. 675-699.
doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154. PMID: 17645413.
- [138] Loebinger, M., Giangreco, A., Groot, K., Prichard, L., Allen, K., Simpson, C., Bazley, L., Navani, N., Tibrewal, S., Davies, D., & Janes, S. (Januar 2008). Squamous cell cancers contain a side population of stem-like cells that are made chemosensitive by ABC transporter blockade. *Br J Cancer*, 98(2), S. 380-387. doi:10.1038/sj.bjc.6604185. Epub 2008 Jan 22. PMID: 18219291; PMCID: PMC2361447.
- [139] Luo, Y., Ren, F., Liu, Y., Shi, Z., Tan, Z., Xiong, H., Dang, Y., & Chen, G. (15. Juli 2015). Clinicopathological and prognostic significance of high Ki-67 labeling index in hepatocellular carcinoma patients: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*, 8(7), S. 10235-10247. PMID: 26379815
- [140] Ma, B., Poon, T., To, K., Zee, B., Mo, F., Chan, C., Ho, S., Teo, P., Johnson, P., & Chan, A. (Oktober 2003). Prognostic significance of tumor angiogenesis, Ki 67, p53 oncoprotein, epidermal growth factor receptor and HER2 receptor protein expression in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma--a prospective study. *Head Neck*, 25(10), S. 864-872.
doi:10.1002/hed.10307. PMID: 12966511
- [141] Mandic, R., Schamberger, C., Müller, J., Geyer, M., Zhu, L., Carey, T., Grénman, R., Dünne, A., & Werner, J. (1. Oktober 2005). Reduced cisplatin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cell lines correlates with mutations affecting the COOH-terminal nuclear localization signal of p53. *Clin Cancer Res*, 11(19 Pt 1), S. 6845-6852. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0378. PMID: 16203773.
- [142] Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (Juli 2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), S. 436-444.
doi:10.1038/nature07205. PMID: 18650914.
- [143] Marur, S., D'Souza, G., Westra, W., & Forastiere, A. (August 2010). HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*, 11(8), S. 781-789. doi:10.1016/S1470-2045(10)70017-6. Epub 2010 May 5. PMID: 20451455; PMCID: PMC5242182.
- [144] Materna, V., Liedert, B., Thomale, J., & Lage, H. (20. Juni 2005). Protection of platinum-DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells. *Int J Cancer*, 115(3), S. 393-402. doi:10.1002/ijc.20899. PMID: 15688364.
- [145] Matsson, P., Pedersen, J., Norinder, U., Bergström, C., & Artursson, P. (August 2009). Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharm Res*, 26(8), S. 1816-1831.
doi:10.1007/s11095-009-9896-0. Epub 2009 May 7. PMID: 19421845.
- [146] McLaren, R., Kuzu, I., Dunnill, M., Harris, A., Lane, D., & Gatter, K. (Oktober 1992). The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer*, 66(4), S. 735-738.
doi:10.1038/bjc.1992.348. PMID: 1329907; PMCID: PMC1977415
- [147] Mehanna, H., Paleri, V., West, C., & Nutting, C. (Februar 2011). Head and neck cancer – part 1: epidemiology, presentation, and preservation. *Clinical*

- Otolaryngology (Clin Otolaryngol)*, 36(1), S. 65-68. doi:10.1111/j.1749-4486.2010.02231.x. PMID: 21414154.
- [148] Mehanna, H., West, C., Nutting, C., & Paleri, V. (April 2011). Head and neck cancer – Part 2: Treatment and prognostic factors. *Clinical Otolaryngology (Clin Otolaryngol)*, 36(2), S. 154-158. doi:10.1111/j.1749-4486.2010.02232.x
- [149] Merlo, L., Pepper, J., Reid, B., & Maley, C. (Dezember 2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*, 6(12), S. 924-935. doi:10.1038/nrc2013. Epub 2006 Nov 16. PMID: 17109012.
- [150] Michel, M., Török, N., Godbout, M., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A., & Germain, L. (Mai 1996). Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci*, 109(Pt 5), S. 1017-1028. PMID: 8743949
- [151] Mielcarek-Kuchta, D., Olofsson, J., & Golusinski, W. (November 2003). p53, Ki67 and cyclin D1 as prognosticators of lymph node metastases in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 260(10), S. 549-554. doi:10.1007/s00405-003-0651-6. Epub 2003 Oct 9. PMID: 14551784
- [152] Mitra, D., Malkoski, S., & Wang, X. (Januar 2011). Cancer Stem Cells in Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel)*, 3(1), S. 415-427. doi:10.3390/cancers3010415. PMID: 24212622; PMCID: PMC3756369.
- [153] Moll, R., Franke, W., Schiller, D., Geiger, B., & Krepler, R. (November 1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), S. 11-24. doi:10.1016/0092-8674(82)90400-7. PMID: 6186379
- [154] Mondal, D., Saha, K., Datta, C., Chatterjee, U., & Sengupta, A. (April 2013). Ki67, p27 and p53 Expression in Squamous Epithelial Lesions of Larynx. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 65(2), S. 126-133. doi:10.1007/s12070-012-0590-x. Epub 2012 Nov 8. PMID: 24427552
- [155] Monteiro, L., Diniz-Freitas, M., Garcia-Caballero, T., Warnakulasuriya, S., Forteza, J., & Fraga, M. (August 2012). Combined cytoplasmic and membranous EGFR and p53 overexpression is a poor prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 41(7), S. 559-567. doi:10.1111/j.1600-0714.2012.01142.x. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22417132
- [156] NCBI - National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. (aktualisiert am 5. April 2020). *NCBI - ABCC2 ATP binding cassette subfamily C member 2 [Homo sapiens (human)]*, Gene ID: 1244, updated on 5-Apr-2020. Abgerufen am 12. April 2020 von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1244/?report=expression>
- [157] Neues Krebsmittel: Oxaliplatin in Deutschland zugelassen. (19. September 1999). *Deutsche Apotheker Zeitung*, (38), S. 48.
- [158] Neville, B., & Day, T. (Juli - August 2002). Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA Cancer J Clin.*, 52(4), S. 195-215. doi:10.3322/canjclin.52.4.195. PMID: 12139232.
- [159] Ni, Z., Mark, M., Cai, X., & Mao, Q. (2010). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis demonstrates dimer/oligomer formation of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in intact cells. *Int J Biochem Mol Biol.*, 1(1), S. 1-11. PMID: 20622991; PMCID: PMC2901148.
- [160] Nie, M., Zhong, L., Zeng, G., & Li, B. (Mai 2002). The changes of cytokeratin 19 during oral carcinogenesis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi; Chin J Stomatol*, 37(3), S. 187-190. PMID: 12419140

- [161] Nowell P. (01. Oktober 1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194(4260), S. 23-28. doi:10.1126/science.959840. PMID: 959840.
- [162] Nylander, K., Stenling, R., Gustafsson, H., Zackrisson, B., & Roos, G. (1. Januar 1995). p53 expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer*, 75(1), S. 87-93. doi:10.1002/1097-0142(19950101)75:1<87::aid-cnrcr2820750115>3.0.co;2-v. PMID: 7804982
- [163] O'Brien, C., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. (Januar 2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), S. 106-110. doi:10.1038/nature05372. Epub 2006 Nov 19. PMID: 17122772.
- [164] Okamoto, A., Chikamatsu, K., Sakakura, K., Hatsushika, K., Takahashi, G., & Masuyama, K. (Juli 2009). Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.*, 45(7), S. 633–639. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.10.003. Epub 2008 Nov 21. PMID: 19027347.
- [165] Oliveira, L., Ribeiro-Silva, A., Costa, J., Simões, A., Matteo, M., & Zucoloto, S. (November 2008). Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106(5), S. 685-695. doi:10.1016/j.tripleo.2008.07.002. Epub 2008 Aug 30. PMID: 18760943
- [166] Parkin, D., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (März - April 2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55(2), S. 74-108. doi:10.3322/canjclin.55.2.74. PMID: 15761078.
- [167] Pastuszewski, W., Dziegiel, P., Krecicki, T., Podhorska-Okolow, M., Ciesielska, U., Gorzyska, E., & Zabel, M. (Jan-Feb 2007). Prognostic significance of metallothionein, p53 protein and Ki-67 antigen expression in laryngeal cancer. *Anticancer Res*. 27(1A), S. 335-342. PMID: 17352251
- [168] Pezzilli, R., Partelli, S., Cannizzaro, R., Pagano, N., Crippa, S., Pagnanelli, M., & Falconi, M. (März 2016). Ki-67 prognostic and therapeutic decision driven marker for pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNEs): A systematic review. *Adv Med Sci*, 61(1), S. 147-153. doi:10.1016/j.advms.2015.10.001. Epub 2015 Oct 23. PMID: 26774266
- [169] Pich, A., Chiusa, L., & Navone, R. (September 2004). Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol*, 15(9), S. 1319-1329. doi:10.1093/annonc/mdh299. PMID: 15319236
- [170] Poljak, M., Gale, N., Kambic, V., Ferluga, D., & Fischinger, J. (Juli-August 1996). Overexpression of p53 protein in benign and malignant laryngeal epithelial lesions. *Anticancer Res*, 16(4A), S. 1947-1951. PMID: 8712726
- [171] Polkowski, W., van Lanschot, J., Ten Kate, F., Baak, J., Tytgat, G., Obertop, H., Voorn, W., & Offerhaus, G. (Juni 1995). The value of p53 and Ki67 as markers for tumour progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol*, 4(3), S. 163-171. doi:10.1016/s0960-7404(10)80021-0. PMID: 7582189
- [172] Prestayko, A., D'Aoust, J., Issell, B., & Crooke, S. (März 1979). Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat Rev.*, 6(1), S. 17-39. doi:10.1016/s0305-7372(79)80057-2. PMID: 378370.
- [173] Prince, M., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G., Kaplan, M., Dalerba, P., Weissman, I., Clarke, M., & Ailles, L. (16. Jan 2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3), S. 973-978.

- doi:10.1073/pnas.0610117104. Epub 2007 Jan 8. PMID: 17210912; PMCID: PMC1783424.
- [174] Pschyrembel, W. (2017). Rezidiv. In *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (267. Aufl.)*. Berlin; Boston: De Gruyter. ISBN: 978-3-11-049497-6.
- [175] Psyri, A., & Fountzilas, G. (2006). Advances in the treatment of locally advanced non-nasopharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Med Oncol.*, 23(1), S. 1-15. doi:10.1385/MO:23:1:1. PMID: 16645225.
- [176] Pyo, J., Kang, G., & Sohn, J. (28. Mai 2016). Ki-67 labeling index can be used as a prognostic marker in gastrointestinal stromal tumor: a systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers*, 31(2), S. e204-e210. doi:10.5301/jbm.5000183. PMID: 26616229
- [177] Quinlan, D., Davidson, A., Summers, C., Warden, H., & Doshi, H. (1. September 1992). Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res*, 52(17), S. 4828-4831. PMID: 1324796
- [178] Quinlan, R., Schiller, D., Hatzfeld, M., Achtstätter, T., Moll, R., Jorcano, J., Magin, T., & Franke, W. (1985). Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann N Y Acad Sci*, 455, S. 282-306. doi:10.1111/j.1749-6632.1985.tb50418.x. PMID: 2417517
- [179] Quintana, E., Shackleton, M., Foster, H., Fullen, D., Sabel, M., Johnson, T., & Morrison, S. (16. November 2010). Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell*, 18(5), S. 510-523. doi:10.1016/j.ccr.2010.10.012. PMID: 21075313; PMCID: PMC3031091.
- [180] Quon, H., Liu, F., & Cummings, B. (Februar 2001). Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*, 23(2), S. 147-159. doi:10.1002/1097-0347(200102)23:2<147::aid-hed1010>3.0.co;2-#. PMID: 11303632
- [181] Ram Prasad, V., Nirmala, N., & Kotian, M. (Januar - März 2005). Immunohistochemical evaluation of expression of cytokeratin 19 in different histological grades of leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Indian J Dent Res.*, 16(1), S. 6-11. PMID: 16375229.
- [182] Rao, S., Fury, M., & Pfister, D. (Juli 2012). Molecular-targeted therapies in head and neck cancer. *Seminars in Radiation Oncology (Semin Radiat Oncol)*, 22(3), S. 207-213. doi:10.1016/j.semradonc.2012.03.005. PMID: 22687945.
- [183] Re, M., Zizzi, A., Ferrante, L., Stramazzotti, D., Goteri, G., Gioacchini, F., Olivieri, F., Magliulo, G., & Rubini, C. (Juni 2014). p63 and Ki-67 immunostainings in laryngeal squamous cell carcinoma are related to survival. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 271(6), S. 1641-1651. doi:10.1007/s00405-013-2833-1. Epub 2014 Jan 9. PMID: 24402377.
- [184] Remmele, W., & Stegner, H. (Mai 1987). Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8(3), S. 138-140. PMID: 3303008.
- [185] Reya, T., Morrison, S., Clarke, M., & Weissman, I. (01. November 2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), S. 105-111. doi:10.1038/35102167. PMID: 11689955.

- [186] Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (4. Januar 2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, *445*(7123), S. 111-115. doi:10.1038/nature05384. Epub 2006 Nov 19. PMID: 17122771.
- [187] Richards-Taylor, S., Ewings, S., Jaynes, E., Tilley, C., Ellis, S., Armstrong, T., Pearce, N., & Cave, J. (Juli 2016). The assessment of Ki-67 as a prognostic marker in neuroendocrine tumours: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol*, *69*(7), S. 612-618. doi:10.1136/jclinpath-2015-203340. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26680267.
- [188] Robey, R., Lin, B., Qiu, J., Chan, L., & Bates, S. (Mai - Juni 2011). Rapid detection of ABC transporter interaction: potential utility in pharmacology. *J Pharmacol Toxicol Methods*, *63*(3), S. 217-222. doi:10.1016/j.vascn.2010.11.003. Epub 2010 Nov 25. PMID: 21112407; PMCID: PMC3086650.
- [189] Robey, R., Steadman, K., Polgar, O., Morisaki, K., Blayney, M., Mistry, P., & Bates, S. (15. Februar 2004). Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res*, *64*(4), S. 1242-1246. doi:10.1158/0008-5472.can-03-3298. PMID: 14973080.
- [190] Rodier, F., Campisi, J., & Bhaumik, D. (2007). Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res.*, *35*(22), S. 7475-7484. doi:10.1093/nar/gkm744. Epub 2007 Oct 16. PMID: 17942417; PMCID: PMC2190721
- [191] Roland, N., Caslin, A., Nash, J., & Stell, P. (Mai-Juni 1992). Value of grading squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*, *14*(3), S. 224-229. doi:10.1002/hed.2880140310. PMID: 1587740
- [192] Römer, L., Klein, C., Dehner, A., Kessler, H., & Buchner, J. (6. Oktober 2006). p53 - a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew Chem Int Ed Engl.*, *45*(39), S. 6440-6460. doi:10.1002/anie.200600611. PMID: 16983711
- [193] Safadi, R., Musleh, A., Al-Khateeb, T., & Hamasha, A. (Dezember 2010). Analysis of immunohistochemical expression of k19 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma using color deconvolution-image analysis method. *Head Neck Pathol*, *4*(4), S. 282-289. doi:10.1007/s12105-010-0210-6. Epub 2010 Sep 30. PMID: 20882374; PMCID: PMC2996498
- [194] Sakai, E., & Tsuchida, N. (Mai 1992). Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene*, *7*(5), S. 927-933. PMID: 1570156
- [195] Santoro, A., Pannone, G., Ninivaggi, R., Petruzzi, M., Santarelli, A., Russo, G., Lepore, S., Pietrafesa, M., Laurenzana, I., Leonardi, R., Bucci, P., Natalicchio, M., Lucchese, A., Papagerakis, S., & Bufo, P. (15. Dezember 2015). Relationship between CK19 expression, deregulation of normal keratinocyte differentiation pattern and high risk-human papilloma virus infection in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Infect Agent Cancer*, *10*, S. 46. doi:10.1186/s13027-015-0041-x. PMID: 26672675; PMCID: PMC4678638.
- [196] Sarafoleanu, D., Postelnicu, V., Iosif, C., Manea, C., & Sarafoleanu, C. (April-Juni 2009). The role of p53, PCNA and Ki-67 as outcome predictors in the treatment of laryngeal cancer. *J Med Life*, *2*(2), S. 219-226. PMID: 20108544; PMCID: PMC3018987
- [197] Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., & Brivanlou, A. (Januar 2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-

- specific inhibitor. *Nat Med*, 10(1), S. 55-63. doi:10.1038/nm979. Epub 2003 Dec 21. PMID: 14702635.
- [198] Scholzen, T., & Gerdes, J. (März 2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3), S. 311-322. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9. PMID: 10653597
- [199] Schwarz, S. (2013). Pathologie und histopathologische Prognosefaktoren oraler Karzinome. *ORALCHIRURGIE JOURNAL - Zeitschrift des Bundesverbandes Deutscher Oralchirurgen*, 3, S. 16-21.
- [200] Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E., & Morrison, S. (4. September 2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 138(5), S. 822-829. doi:10.1016/j.cell.2009.08.017. PMID: 19737509.
- [201] Shaw, R., Christensen, A., Java, K., Maddani, R., Liloglou, T., Asterios, T., von Buchwald, C., Wessel, I., Kiss, K., Kjaer, A., Lelkaitis, G., Long, A., Risk, J., & Robinson, M. (November 2016). Intraoperative Sentinel Lymph Node Evaluation: Implications of Cytokeratin 19 Expression for the Adoption of OSNA in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 23(12), S. 4042-4048. doi:10.1245/s10434-016-5337-6. Epub 2016 Jul 8. PMID: 27393570; PMCID: PMC5047925
- [202] Shen, B., Dong, P., Li, D., & Gao, S. (November 2011). Expression and function of ABCG2 in head and neck squamous cell carcinoma and cell lines. *Exp Ther Med*, 2(6), S. 1151-1157. doi:10.3892/etm.2011.331. Epub 2011 Aug 11. PMID: 22977636; PMCID: PMC3440784.
- [203] Siewert, E., Dietrich, C., Lammert, F., Heinrich, P., Matern, S., Gartung, C., & Geier, A. (10. September 2004). Interleukin-6 regulates hepatic transporters during acute-phase response. *Biochem Biophys Res Commun*, 322(1), S. 232-238. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.102. PMID: 15313196.
- [204] Silva, N., & Shedd, D. (1971). Pattern of lymphatic spread in pharyngeal cancer. *Journal of surgical oncology (J Surg Oncol)*, 3(4), S. 415-419. doi: 10.1002/jso.2930030407. PMID: 5097624.
- [205] Singh, S., Hawkins, C., Clarke, I., Squire, J., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R., Cusimano, M., & Dirks, P. (18. November 2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), S. 396-401. doi:10.1038/nature03128. PMID: 15549107.
- [206] Sittel, C., Eckel, H., Damm, M., von Pritzbuer, E., & Kvasnicka, H. (Juni 2000). Ki-67 (MIB1), p53, and Lewis-X (LeuM1) as prognostic factors of recurrence in T1 and T2 laryngeal carcinoma. *Laryngoscope*, 110(6), S. 1012-1017. doi:10.1097/00005537-200006000-00024. PMID: 10852523.
- [207] Slootweg, P., Koole, R., & Hordijk, G. (1994). The presence of p53 protein in relation to Ki-67 as cellular proliferation marker in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent dysplastic mucosa. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 30B(2), S. 138-141. doi:10.1016/0964-1955(94)90066-3. PMID: 8032302
- [208] Smith, B., Haffty, B., & Sasaki, C. (März 2001). Molecular markers in head and neck squamous cell carcinoma: their biological function and prognostic significance. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 110(3), S. 221-228. doi:10.1177/000348940111000304. PMID: 11269765
- [209] Sobocki, M., Mrouj, K., Colinge, J., Gerbe, F., Jay, P., Krasinska, L., Dulic, V., & Fisher, D. (15. Mai 2017). Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res*, 77(10), S. 2722-2734. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0707. Epub 2017 Mar 10. PMID: 28283655
- [210] Sobocki, M., Mrouj, K., Camasses, A., Parisis, N., Nicolas, E., Llères, D., Gerbe, F., Prieto, S., Krasinska, L., David, A., Eguren, M., Birling, M.,

- Urbach, S., Hem, S., Déjardin, J., Malumbres, M., Jay, P., Dulic, V., Lafontaine, D., Feil, R., & Fisher, D. (7. März 2016). The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *eLife*, *5*, e13722. doi:10.7554/eLife.13722. PMID: 26949251; PMCID: PMC4841783
- [211] Sombroek, C., Stam, A., Masterson, A., Lougheed, S., Schakel, M., Meijer, C., Pinedo, H., van den Eertwegh, A., Scheper, R., & de Gruijl, T. (1. Mai 2002). Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J Immunol*, *168*(9), S. 4333-4343. doi:10.4049/jimmunol.168.9.4333. PMID: 11970975.
- [212] Song, J., Chang, I., Chen, Z., Kang, M., & Wang, C. (6. Juli 2010). Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS One*, *5*(7), e11456. doi:10.1371/journal.pone.0011456. PMID: 20625515; PMCID: PMC2897893.
- [213] Soudi, A., Gao, C., Wang, L., Milgrom, E., & Shen, W. (August 2006). ELM1 is required for multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *173*(4), S. 1919-1937. doi:10.1534/genetics.106.057596. Epub 2006 Jun 4. PMID: 16751665; PMCID: PMC1569693.
- [214] Stacy, A., Jansson, P., & Richardson, D. (November 2013). Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance. *Mol Pharmacol*, *84*(5), S. 655-669. doi:10.1124/mol.113.088609. Epub 2013 Sep 10. PMID: 24021215
- [215] Stenzinger, A., Kriegsmann, M., Kraywinkel, K., & Weichert, W. (2014). Pathologie der malignen Kopf-Hals-Tumoren: Epidemiologie und histologische Subtypen. *Onkologe*, *20*, S. 116-129.
- [216] Sterz, C., Kulle, C., Dakic, B., Makarova, G., Böttcher, M., Bette, M., Werner, J., & Mandic, R. (Februar 2010). A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral Oncol*, *46*(2), S. 116-122. doi:10.1016/j.oraloncology.2009.11.011. Epub 2009 Dec 29. PMID: 20036607
- [217] Stordal, B., Pavlakis, N., & Davey, R. (Juni 2007). Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev*, *33*(4), S. 347-357. doi:10.1016/j.ctrv.2007.01.009. Epub 2007 Mar 23. PMID: 17383100.
- [218] Stuart-Harris, R., Caldas, C., Pinder, S., & Pharoah, P. (August 2008). Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32.825 patients. *Breast*, *17*(4), S. 323-334. doi:10.1016/j.breast.2008.02.002. Epub 2008 May 2. PMID: 18455396.
- [219] Su, L., Morgan, P., Thomas, J., & Lane, E. (April 1993). Expression of keratin 14 and 19 mRNA and protein in normal oral epithelia, hairy leukoplakia, tongue biting and white sponge nevus. *J Oral Pathol Med*, *22*(4), S. 183-189. doi:10.1111/j.1600-0714.1993.tb01054.x. PMID: 7686226
- [220] Sun, G., Fujii, M., Sonoda, A., Tokumaru, Y., Matsunaga, T., & Habu, N. (Juni 2010). Identification of stem-like cells in head and neck cancer cell lines. *Anticancer Res*, *30*(6), S. 2005-2010. PMID: 20651344.
- [221] Sun, X., & Kaufman, P. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, *127*(2), S. 175-186. doi:10.1007/s00412-018-0659-8. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29322240; PMCID: PMC5945335.
- [222] Sun, X., Bizhanova, A., Matheson, T., Yu, J., Zhu, L., & Kaufman, P. (11. August 2017). Ki-67 Contributes to Normal Cell Cycle Progression and

- Inactive X Heterochromatin in p21 Checkpoint-Proficient Human Cells. *Mol Cell Biol*, 37(17), e00569-16. doi:10.1128/MCB.00569-16. PMID: 28630280; PMCID: PMC5559680
- [223] Suo, Z., Holm, R., & Nesland, J. (Juli 1993). Squamous cell carcinomas. An immunohistochemical study of cytokeratins and involucrin in primary and metastatic tumours. *Histopathology*, 23(1), S. 45-54. doi:10.1111/j.1365-2559.1993.tb01182.x. PMID: 7690007
- [224] Surowiak, P., Materna, V., Kaplenko, I., Spaczynski, M., Dolinska-Krajewska, B., Gebarowska, E., Dietel, M., Zabel, M., & Lage, H. (1. Dezember 2006). ABCC2 (MRP2, cMOAT) can be localized in the nuclear membrane of ovarian carcinomas and correlates with resistance to cisplatin and clinical outcome. *Clin Cancer Res*, 12(23), S. 7149-7158. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0564. PMID: 17145840.
- [225] Takagi, M., Natsume, T., Kanemaki, M., & Imamoto, N. (Oktober 2016). Perichromosomal protein Ki67 supports mitotic chromosome architecture. *Genes Cells*, 21(10), S. 1113-1124. doi:10.1111/gtc.12420. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27610954
- [226] Takahashi-Yanaga, F., & Kahn, M. (15. Juni 2010). Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res*, 16(12), S. 3153-3162. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2943. Epub 2010 Jun 8. PMID: 20530697.
- [227] Takano, M., Yumoto, R., & Murakami, T. (Januar 2006). Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacol Ther*, 109(1-2), S. 137-161. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.06.005. Epub 2005 Oct 4. PMID: 16209890.
- [228] Takeda, T., Sugihara, K., Hirayama, Y., Tanuma, J., & Semba, I. (Juli 2006). Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. *J Oral Pathol Med*, 35(6), S. 369-375. doi:10.1111/j.1600-0714.2006.00444.x. PMID: 16762018.
- [229] Theile, D., Detering, J., Herold-Mende, C., Dyckhoff, G., Haefeli, W., Weiss, J., & Burhenne, J. (April 2012). Cellular pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of platinum cytostatics in head and neck squamous cell carcinoma evaluated by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Pharmacol Exp Ther*, 341(1), S. 51-58. doi:10.1124/jpet.111.189621. Epub 2011 Dec 29. PMID: 22207655.
- [230] Thomas, G., Nadiminti, H., & Regalado, J. (Dezember 2005). Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol*, 86(6), S. 347-363. doi:10.1111/j.0959-9673.2005.00447.x. PMID: 16309541; PMCID: PMC2517451
- [231] Tian, C., Ambrosone, C., Darcy, K., Krivak, T., Armstrong, D., Bookman, M., Davis, W., Zhao, H., Moysich, K., Gallion, H., & DeLoia, J. (März 2012). Common variants in ABCB1, ABCC2 and ABCG2 genes and clinical outcomes among women with advanced stage ovarian cancer treated with platinum and taxane-based chemotherapy: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*, 124(3), S. 575-581. doi:10.1016/j.ygyno.2011.11.022. Epub 2011 Nov 21. PMID: 22112610; PMCID: PMC3278512.
- [232] Tinhofer-Keilholz, I. (2014). Die Tumorbilogie von Kopf-Hals-Tumoren. *Onkologe*, 20, S. 130-138. doi:10.1007/s00761-013-2585-y
- [233] Tomasino, R., Morello, V., Bazan, V., Nagar, C., Tralongo, V., Dardanoni, G., Ingria, F., Monteleone, G., Restivo, S., Nuara, R., Daniele, E., & Russo, A. (September 1994). P53 expression in stage III-IV squamous-cell carcinoma of the larynx - an immunohistochemical study related to

- clinicopathological, flow-cytometric DNA analysis and prognosis. *Int J Oncol*, 5(3), S. 495-500. doi:10.3892/ijo.5.3.495. PMID: 21559604
- [234] Tonigold, M., Rossmann, A., Meinold, M., Bette, M., Märken, M., Henkenius, K., Bretz, A., Giel, G., Cai, C., Rodepeter, F., Beneš, V., Grénman, R., Carey, T., Lage, H., Stiewe, T., Neubauer, A., Werner, J., Brendel, C., & Mandic, R. (Oktober 2014). A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic p53(mut) exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels. *J Cancer Res Clin Oncol*, 140(10), S. 1689-1704. doi:10.1007/s00432-014-1727-y. Epub 2014 Jun 10. PMID: 24913304.
- [235] Toyoshima, T., Vairaktaris, E., Nkenke, E., Schlegel, K., Neukam, F., & Ries, J. (April 2008). Cytokeratin 17 mRNA expression has potential for diagnostic marker of oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 134(4), S. 515-521. doi:10.1007/s00432-007-0308-8. Epub 2007 Sep 4. Erratum in: *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Apr;134(4):523-524. PMID: 17786476.
- [236] Trovato, M., Ruggeri, R., Guzzo, E., Certo, R., Alibrandi, A., Scifo, S., Scardigno, M., Vitarelli, E., Arena, G., Gambadoro, O., Catalano, N., Bourdon, J., Galletti, B., Galletti, F., & Cavallari, V. (April 2017). Expression of P53 and isoforms in benign and malignant lesions of the head and neck. *Histol Histopathol*, 32(4), S. 371-377. doi:10.14670/HH-11-802. Epub 2016 Jul 14. PMID: 27411919
- [237] Tseng, S., Jarvinen, M., Nelson, W., Huang, J., Woodcock-Mitchell, J., & Sun, T. (September 1982). Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell*, 30(2), S. 361-372. doi:10.1016/0092-8674(82)90234-3. PMID: 6183000.
- [238] Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., & DuBois, R. (29. Mai 1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93(5), S. 705-716. doi:10.1016/s0092-8674(00)81433-6. Erratum in: *Cell* 1998 Jul 24;94(2):273. PMID: 9630216.
- [239] Tungekar, M., Gatter, K., Dunnill, M., & Mason, D. (Dezember 1991). Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer. *Histopathology*, 19(6), S. 545-550. doi:10.1111/j.1365-2559.1991.tb01503.x. PMID: 1664810
- [240] U.S. Food and Drug Administration. (07.10.2015). *Drug Safety and Availability - Postmarket Drug Safety Information for Patients and Providers - Eloxatin Information*. Abgerufen am 02.12.2020 von <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/eloxatin-information>
- [241] van den Broek, G., Wildeman, M., Rasch, C., Armstrong, N., Schuurin, E., Begg, A., Looijenga, L., Scheper, R., van der Wal, J., Menkema, L., van Diest, P., Balm, A., van Velthuysen, M., & van den Brekel, M. (1. Juni 2009). Molecular markers predict outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck after concomitant cisplatin-based chemoradiation. *Int J Cancer*, 124(11), S. 2643-2650. doi:10.1002/ijc.24254. PMID: 19253368.
- [242] van der Velden, L., Schaafsma, H., Manni, J., Ramaekers, F., & Kuijpers, W. (März - April 1993). Cytokeratin expression in normal and (pre)malignant head and neck epithelia: an overview. *Head Neck*, 15(2), S.133-146. doi:10.1002/hed.2880150209. PMID: 7680025.
- [243] Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. (April 2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*, 3(3), S. 281-290. doi:10.1186/1479-7364-3-3-281. PMID: 19403462; PMCID: PMC2752038.

- [244] Vielba, R., Bilbao, J., Ispizua, A., Zabalza, I., Alfaro, J., Rezola, R., Moreno, E., Elorriaga, J., Alonso, I., Baroja, A., & de la Hoz, C. (Januar 2003). p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope*, *113*(1), S. 167-172. doi:10.1097/00005537-200301000-00031. PMID: 12514403.
- [245] Visvader, J., & Lindeman, G. (Oktober 2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, *8*(10), S. 755-768. doi:10.1038/nrc2499. Epub 2008 Sep 11. PMID: 18784658.
- [246] Vivanco, I., & Sawyers, C. (Juli 2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, *2*(7), S. 489–501. doi:10.1038/nrc839. PMID: 12094235.
- [247] Vlaming, M., Pala, Z., van Esch, A., Wagenaar, E., de Waart, D., van de Wetering, K., van der Kruijssen, C., Oude Elferink, R., van Tellingen, O., & Schinkel, A. (1. Mai 2009). Functionally overlapping roles of Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) in the elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo. *Clin Cancer Res*, *15*(9), S. 3084-3093. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2940. Epub 2009 Apr 21. PMID: 19383815.
- [248] Walcher, L., Kistenmacher, A., Suo, H., Kitte, R., Dluczek, S., Strauß, A., Blaudszun, A., Yevsa, T., Fricke, S., & Kossatz-Boehlert, U. (7. August 2020). Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol*, *11*, S. 1280. doi:10.3389/fimmu.2020.01280. PMID: 32849491; PMCID: PMC7426526
- [249] Wang, H., Lee, E., Cai, X., Ni, Z., Zhou, L., & Mao, Q. (30. Dezember 2008). Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence. *Biochemistry*, *47*(52), S. 13778-13787. doi:10.1021/bi801644v. PMID: 19063604; PMCID: PMC2649121.
- [250] Wienecke, A., & Kraywinkel, K. (November 2018). Tabakassoziierte Krebserkrankungen in Deutschland – Entwicklung der Inzidenz und Mortalität seit 1995 [Tobacco-associated cancers in Germany-incidence and mortality trends since 1995]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, *61*(11), S. 1399-1406. doi:10.1007/s00103-018-2821-0. PMID: 30264232.
- [251] Wu, C., & Alman, B. (8. September 2008). Side population cells in human cancers. *Cancer Lett*, *268*(1), S. 1-9. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.048. Epub 2008 May 19. PMID: 18487012.
- [252] Wu, M., Jan, C., Tsay, Y., Yu, Y., Huang, C., Lin, S., Liu, C., Chen, Y., Lo, J., & Yu, C. (27. Oktober 2010). Elimination of head and neck cancer initiating cells through targeting glucose regulated protein78 signaling. *Mol Cancer*, *9*, S. 283. doi:10.1186/1476-4598-9-283. PMID: 20979610; PMCID: PMC2987982.
- [253] Xie, S., Fang, W., Liu, T., Yao, K., & Zhong, X. (2010). Association of ABCC2 and CDDP-Resistance in Two Sublines Resistant to CDDP Derived from a Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line. *J Oncol*, *2010*, S. 915046. doi:10.1155/2010/915046. Epub 2010 Jun 13. PMID: 20628484; PMCID: PMC2902222.
- [254] Yanamoto, S., Yamada, S., Takahashi, H., Naruse, T., Matsushita, Y., Ikeda, H., Shiraishi, T., Seki, S., Fujita, S., Ikeda, T., Asahina, I., & Umeda, M. (April 2014). Expression of the cancer stem cell markers CD44v6 and ABCG2 in tongue cancer: effect of neoadjuvant chemotherapy on local

- recurrence. *Int J Oncol*, 44(4), S. 1153-1162. doi:10.3892/ijo.2014.2289. Epub 2014 Feb 4. PMID: 24504189
- [255] Yin, X., Smith, M., Whiteside, T., Johnson, J., Herberman, R., & Locker, J. (8. Mai 1993). Abnormalities in the p53 gene in tumors and cell lines of human squamous-cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer*, 54(2), S. 322-327. doi:10.1002/ijc.2910540226. PMID: 8098018.
- [256] Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., & Oren, M. (25. Juli 1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 352(6333), S. 345-347. doi:10.1038/352345a0. PMID: 1852210.
- [257] Zechner, D., Fujita, Y., Hülsken, J., Müller, T., Walther, I., Taketo, M., Crenshaw, E., 3rd, Birchmeier, W., & Birchmeier, C. (15. Juni 2003). Beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol*, 258(2), S. 406-418. doi:10.1016/s0012-1606(03)00123-4. PMID: 12798297.
- [258] Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, (Hrsg.). (2016). *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. Berlin: RKI.
- [259] Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, (Hrsg.). (2012). *Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe*. Berlin: RKI.
- [260] Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, (Hrsg.). (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010, 9. Ausgabe*. Berlin: RKI.
- [261] Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, (Hrsg.). (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Ausgabe*. Berlin: RKI.
- [262] Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, (Hrsg.). (2019). *Krebs in Deutschland 2015/2016, 12. Ausgabe*. Berlin: RKI.
- [263] Zhang, Q., Shi, S., Yen, Y., Brown, J., Ta, J., & Le, A. (März 2010). A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett*, 289(2), S. 151-160. doi:10.1016/j.canlet.2009.08.010. Epub 2009 Sep 11. PMID: 19748175.
- [264] Zhang, Z., Filho, M., & Nör, J. (Januar 2012). The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncology (Oral Oncol)*, 48(1), S. 1-9. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.10.004. Epub 2011 Nov 8. PMID: 22070916; PMCID: PMC3261238.
- [265] Zhong, L., Chen, W., Zhang, C., & Zhang, Z. (September 2007). Increased CK19 expression correlated with pathologic differentiation grade and prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 104(3), S. 377-384. doi:10.1016/j.tripleo.2006.07.019. Epub 2006 Nov 7. PMID: 17095259.
- [266] Zidar, N., Gale, N., Cör, A., & Kambic, V. (Mai 1996). Expression of Ki-67 antigen and proliferative cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the larynx. *J Laryngol Otol*, 110(5), S. 440-445. doi:10.1017/s0022215100133924. PMID: 8762312.

8 TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 10. Gesamtliste der eingeschlossenen Präparate

Fall nach Lokalisation	Tumor	Lokalisation	Grading	T1/2/3-4	T (Eintrag)	N+/N0/k.A.	N (Eintrag)	M 0/1/k.A.	M (Eintrag)	Erstdiagnose
NPH 1	SCC	Nasopharynx	G2	TX/k.A.	k. A.	NX	k. A.	k.A.	k. A.	03/09
HPH 1	SCC	Hypopharynx	G1	T3-T4	T3-T4	N+	N2b	M0	M0	03/09
HPH 2	SCC	Hypopharynx	G3	T2	T2	N+	N2c	M0	M0	09/09
HPH 3	SCC	Hypopharynx	G2	T3-T4	T4	N+	N2a	M0	M0	k.A.
HPH 4	SCC	Hypopharynx	G3	T3-T4	T3	N+	N2b	k.A.	k. A.	03/07
HPH 5	SCC	Hypopharynx	G3	T3-T4	T4	N+	N2b	M0	M0	08/08
HPH 6	SCC	Hypopharynx	G2	T2	T2	N+	N2	M0	M0	10/10
HPH 7	SCC	Hypopharynx	G2	T1	T1	N+	N1	k.A.	k. A.	02/08
HPH 8	SCC	Hypopharynx	G2	T2	T2	N+	N2c	M0	M0	06/09
HPH 9	SCC	Hypopharynx	G3	T3-T4	T3	N+	N2b	M0	M0	10/08
HPH 10	SCC	Hypopharynx	G3	T1	T1	N+	N1	M0	M0	12/09
HPH 11	SCC	Hypopharynx	G3	T3-T4	T3	N+	N2	M1	M1	10/08
HPH 12	SCC	Hypopharynx	G3	T3-T4	T4	N+	N2c	M1	M1	06/09
HPH 13	SCC	Hypopharynx	G2	T3-T4	T3	N+	N2b	M0	M0	2003
HPH 14	SCC	Hypopharynx	G3	T3-T4	T3	N+	N2c	M0	M0	05/08
HPH 15	SCC	Hypopharynx	G3	T3-T4	T4	N+	N2c	M0	M0	03/09
HPH 16	SCC	Hypopharynx	G2	T2	T2	N+	N2b	M0	M0	08/09
HPH 17	SCC	Hypopharynx	G3	T1	T1	N+	N1	M0	M0	02/10
HPH 18	SCC	Hypopharynx	G2	T3-T4	T3	N+	N2a	M0	M0	12/09
LAR 1	SCC	Larynx	G2	T1	T1	N0	N0	k.A.	k. A.	01/09
LAR 2	SCC	Larynx	G2	T1	T1	NX	k. A.	k.A.	MX	06/09
LAR 3	SCC	Larynx	G2	T2	T2	N0	N0	M0	M0	07/08
LAR 4	SCC	Larynx	G2	T2	T2	NX	k. A.	k.A.	k. A.	12/07
LAR 5	SCC	Larynx	G2	T1	T1a	N0	N0	M0	M0	03/09
LAR 6	SCC	Larynx	G2	T1	T1a	N0	N0	M0	M0	03/09
LAR 7	SCC	Larynx	G2	T2	T2	N+	N2	M0	M0	05/09
LAR 8	SCC	Larynx	G2	T1	T1	N0	N0	k.A.	k. A.	11/10
LAR 9	SCC	Larynx	G2	T2	T2	N+	N2c	k.A.	k. A.	03/08
LAR 10	SCC	Larynx	G2	T3-T4	T4	N+	N1	M0	M0	11/10
LAR 11	SCC	Larynx	G3	T1	T1a	N0	N0	M0	M0	10/08
LAR 12	SCC	Larynx	G2	T1	T1	NX	k. A.	k.A.	k. A.	06/05
LAR 13	SCC	Larynx	G2	T3-T4	T3	N0	N0	M0	M0	09/07
LAR 14	SCC	Larynx	G2	T3-T4	T3	NX	k. A.	M0	M0	08/10
LAR 15	SCC	Larynx	G2	T3-T4	T3	N+	N2c	M0	M0	05/09
LAR 16	SCC	Larynx	G1	T2	T2	N+	N1	M0	M0	06/08
LAR 17	SCC	Larynx	G3	T3-T4	T4a	N0	N0	k.A.	k. A.	08/08
LAR 18	SCC	Larynx	G2	T3-T4	T3	N0	N0	M0	M0	08/10
LAR 19	SCC	Larynx	G2	T1	T1	N0	N0	k.A.	k. A.	07/09
LAR 20	SCC	Larynx	G1	T1	T1a	N0	N0	M0	M0	06/10
LAR 21	SCC	Larynx	G2	T1	T1	N0	N0	k.A.	MX	12/09
LAR 22	SCC	Larynx	G2	T1	T1b	NX	k. A.	k.A.	k. A.	05/10
LAR 23	SCC	Larynx	G2	T1	T1a	N0	N0	k.A.	k. A.	07/08

Fall nach Lokalisation	Tumor	Lokalisation	Grading	T1/2/3-4	T (Eintrag)	N+/N0/k.A.	N (Eintrag)	M 0/1/k.A.	M (Eintrag)	Erstdiagnose
LAR 24	SCC	Larynx	G2	T2	T2	N0	N0	M0	M0	10/07
LAR 25	SCC	Larynx	G2	T2	T2	N0	N0	k.A.	k. A.	02/07
LAR 26	SCC	Larynx	G2	T2	T2	N0	N0	k.A.	k. A.	06/10
LAR 27	SCC	Larynx	G2	T1	T1b	N0	N0	M0	M0	11/08
LAR 28	SCC	Larynx	G2	T2	T2	N0	N0	M0	M0	09/08
LAR 29	SCC	Larynx	G1	T1	T1a	N0	N0	M0	M0	07/09
LAR 30	SCC	Larynx	G2	T1	T1	N0	N0	k.A.	k. A.	08/10
LAR 31	SCC	Larynx	G2	T2	T2	N0	N0	k.A.	k. A.	10/09
LAR 32	SCC	Larynx	G1	T1	T1b	N0	N0	M0	M0	04/06
LAR 33	SCC	Larynx	G2	TX/k.A.	TX	N+	N2b	k.A.	k. A.	05/09
LAR 34	SCC	Larynx	G3	T3-T4	T4a	N0	N0	M0	M0	03/10
LAR 35	SCC	Larynx	G1	T1	T1	N0	N0	M0	M0	03/10
LAR 36	SCC	Larynx	G2	T3-T4	T3	N+	N2c	M0	M0	05/09
LAR 37	SCC	Larynx	G1	T1	T1a	N0	N0	M0	M0	10/07
LAR 38	SCC	Larynx	G2	T1	T1	N+	N2c	M0	M0	04/08
LAR 39	SCC	Larynx	G2	T2	T2	N+	N1	k.A.	MX	04/09
LAR 40	SCC	Larynx	G2	T2	T2	N+	N+	k.A.	k. A.	03/09
LAR 41	SCC	Larynx	G2	T3-T4	T4a	N0	N0	k.A.	k. A.	06/09
LAR 42	SCC	Larynx	G2	T1	T1	N0	N0	k.A.	k. A.	06/10
LAR 43	SCC	Larynx	G2	T1	T1a	N0	N0	k.A.	k. A.	04/09
LAR 44	SCC	Larynx	G2	T3-T4	T4	N+	N2b	k.A.	k. A.	03/09
LAR 45	SCC	Larynx	G2	T1	T1	N0	N0	k.A.	MX	09/05
LAR 46	SCC	Larynx	G1	T1	T1a	N0	N0	M0	M0	02/08
LAR 47	SCC	Larynx	G2	T2	T2	N0	N0	M0	M0	1988
MUH 1	SCC	Mundhöhle	G2	T3-T4	T4	N+	N2c	M0	M0	03/09
MUH 2	SCC	Mundhöhle	G2	T1	T1	N0	N0	M0	M0	07/07
MUH 3	SCC	Mundhöhle	G2	T3-T4	T4	N0	N0	M0	M0	11/08
MUH 4	SCC	Mundhöhle	G2	T1	T1	N+	N2b	k.A.	k. A.	05/10
MUH 5	SCC	Mundhöhle	G2	T2	T2	N0	N0	k.A.	k. A.	09/09
MUH 6	SCC	Mundhöhle	G2	T3-T4	T3	N+	N2c	M0	M0	12/08
MUH 7	SCC	Mundhöhle	G2	T1	T1	N0	N0	k.A.	k. A.	07/08
MUH 8	SCC	Mundhöhle	G2	T3-T4	T3	N+	N2c	M0	M0	02/09
MUH 9	SCC	Mundhöhle	G3	T1	T1	N0	N0	M0	M0	07/08
MUH 10	SCC	Mundhöhle	G2	T3-T4	T4b	N+	N2b	M0	M0	06/10
OPH 1	SCC	Oropharynx	G2	T2	T2	N+	N2b	k.A.	k. A.	06/08
OPH 2	SCC	Oropharynx	G2	T3-T4	T4	N+	N2c	M0	M0	10/09
OPH 3	SCC	Oropharynx	G2	T3-T4	T4	N+	N2b	M0	M0	03/08
OPH 4	SCC	Oropharynx	G2	T3-T4	T4	N+	N2c	M0	M0	09/10
OPH 5	SCC	Oropharynx	G2	T2	T2	N0	N0	k.A.	k. A.	07/09
OPH 6	SCC	Oropharynx	G2	T2	T2	N0	N0	k.A.	k. A.	05/09
OPH 7	SCC	Oropharynx	G2	T3-T4	T4c	N0	N0	M0	M0	09/09
OPH 8	SCC	Oropharynx	G3	T2	T2	N0	N0	M0	M0	03/09
OPH 9	SCC	Oropharynx	G2	T2	T2	N+	N2c	k.A.	k. A.	03/10
OPH 10	SCC	Oropharynx	G2	T3-T4	T4	N+	N2b	k.A.	k. A.	02/09
OPH 11	SCC	Oropharynx	G2	T1	T1	N+	N1	k.A.	MX	09/09
OPH 12	SCC	Oropharynx	G2	T2	T2	N0	N0	M0	M0	03/09
OPH 13	SCC	Oropharynx	G3	T2	T2	NX	k. A.	k.A.	k. A.	04/09
OPH 14	SCC	Oropharynx	G2	T2	T2	N0	N0	k.A.	k. A.	05/08

Fall nach Lokalisation	Tumor	Lokalisation	Grading	T1/2/3-4	T (Eintrag)	N+/N0/k.A.	N (Eintrag)	M 0/1/k.A.	M (Eintrag)	Erstdiagnose
OPH 15	SCC	Oropharynx	G3	T1	T1	N0	N0	M0	M0	08/08
OPH 16	SCC	Oropharynx	G2	TX/k.A.	k. A.	NX	k. A.	k.A.	k. A.	05/08
OPH 17	SCC	Oropharynx	G2	T3-T4	T3	N0	N0	k.A.	MX	08/09
OPH 18	SCC	Oropharynx	G2	T2	T2	N+	N1	M0	M0	12/08
OPH 19	SCC	Oropharynx	G2	T3-T4	T4b	NX	k. A.	k.A.	k. A.	08/06
OPH 20	SCC	Oropharynx	G2	T3-T4	T4a	N+	N2b	M0	M0	12/07
OPH 21	SCC	Oropharynx	G2	T2	T2	N0	N0	M0	M0	03/06
OPH 22	SCC	Oropharynx	G2	T2	T2	N0	N0	k.A.	k. A.	2003
Kontrolle 1	normale SH	Adenoide Vegetationen								
Kontrolle 2	normale SH	Adenoide Vegetationen								
Kontrolle 3	normale SH	Pharynxmukosa								
Kontrolle 4	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 5	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 6	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 7	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 8	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 9	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 11	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 10	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 12	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 13	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 14	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 15	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 16	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 17	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 18	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 19	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 20	normale SH	Tonsille								
Kontrolle 21	normale SH	Tonsille								

cp = zytoplasmatisch, n= nukleär, m= membranär, nb = nicht beurteilbar, neg. = negativ, k. A. = keine Angabe, HPH= Hypopharynx, LAR= Larynx, MUH= Mundhöhle, NPH= Nasopharynx, OPH= Oropharynx, SCC= Squamous Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinom), SH= Schleimhaut

Score kumuliert: 1=schwach (Score 1-3), 2= mäßig (Score 4, 6), 3= stark (Score 8, 9, 12)

((+)) = sehr schwach positiv, (+) = schwach positiv, + = einfach positiv, ++ = zweifach positiv, +++ = dreifach positiv

Fall nach Lokalisation	HPV	Rauchen	Alkohol-anamnese	vorbehandelt	nativ/vor-behandelt	Chemo-therapie	Radiatio	Geschlecht	Alter	Alters-gruppen
NPH 1	k. A.	k. A.	k. A.	ja	behandelt	ja	ja	w	53	<55
HPH 1	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	51	<55
HPH 2	k. A.	Raucher	ja	nein	nativ	nein	nein	m	57	55-65
HPH 3	k. A.	Raucher	ja	ja	behandelt (anderer Tu)	ja	ja	w	63	55-65
HPH 4	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	66	> 65
HPH 5	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	57	55-65
HPH 6	k. A.	anzunehmen	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	72	> 65
HPH 7	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	69	> 65
HPH 8	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	52	<55
HPH 9	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	74	> 65
HPH 10	k. A.	anzunehmen	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	64	55-65
HPH 11	k. A.	anzunehmen	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	63	55-65
HPH 12	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	60	55-65
HPH 13	k. A.	k. A.	k. A.	ja	behandelt	ja	ja	m	48	<55
HPH 14	k. A.	anzunehmen	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	70	> 65
HPH 15	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	71	> 65
HPH 16	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	57	55-65
HPH 17	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	62	55-65
HPH 18	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	52	<55
LAR 1	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	54	<55
LAR 2	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	77	> 65
LAR 3	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	72	> 65
LAR 4	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	54	<55
LAR 5	negativ	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	81	> 65
LAR 6	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	55	55-65
LAR 7	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	58	55-65
LAR 8	k. A.	anzunehmen	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	80	> 65
LAR 9	k. A.	anzunehmen	ja	nein	nativ	nein	nein	m	51	<55
LAR 10	k. A.	Raucher	nein	nein	nativ	nein	nein	w	71	> 65
LAR 11	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	61	55-65
LAR 12	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	66	> 65
LAR 13	k. A.	k. A.	k. A.	ja	bestrahlt	nein	ja	m	78	> 65
LAR 14	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	62	55-65
LAR 15	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	59	55-65
LAR 16	k. A.	k. A.	ja	nein	nativ	nein	nein	m	53	<55
LAR 17	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	76	> 65
LAR 18	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	75	> 65
LAR 19	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	w	47	<55
LAR 20	k. A.	anzunehmen	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	70	> 65
LAR 21	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	w	50	<55
LAR 22	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	63	55-65
LAR 23	k. A.	Raucher	ja	nein	nativ	nein	nein	m	57	55-65
LAR 24	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	56	55-65
LAR 25	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	65	55-65
LAR 26	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	80	> 65
LAR 27	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	68	> 65

Fall nach Lokalisation	HPV	Rauchen	Alkohol-anamnese	vorbehandelt	nativ/vor-behandelt	Chemo-therapie	Radiatio	Geschlecht	Alter	Alters-gruppen
LAR 28	k. A.	anzunehmen	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	65	55-65
LAR 29	negativ	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	47	<55
LAR 30	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	57	55-65
LAR 31	k. A.	Raucher	ja	nein	nativ	nein	nein	m	71	> 65
LAR 32	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	67	> 65
LAR 33	negativ	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	w	58	55-65
LAR 34	k. A.	Raucher	k. A.	ja	behandelt	ja	ja	m	59	55-65
LAR 35	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	72	> 65
LAR 36	k. A.	Raucher	ja	nein	nativ	nein	nein	m	43	<55
LAR 37	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	61	55-65
LAR 38	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	w	57	55-65
LAR 39	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	68	> 65
LAR 40	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	70	> 65
LAR 41	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	w	61	55-65
LAR 42	negativ	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	56	55-65
LAR 43	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	64	55-65
LAR 44	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	73	> 65
LAR 45	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	77	> 65
LAR 46	negativ	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	58	55-65
LAR 47	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	69	> 65
MUH 1	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	65	55-65
MUH 2	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	w	77	> 65
MUH 3	k. A.	k. A.	ja	ja	bestrahlt (anderer Tumor)	nein	ja	m	41	<55
MUH 4	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	51	<55
MUH 5	negativ	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	w	53	<55
MUH 6	k. A.	Raucher	ja	ja	behandelt	ja	ja	w	51	<55
MUH 7	k. A.	Raucher	ja	nein	nativ	nein	nein	m	57	55-65
MUH 8	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	68	> 65
MUH 9	k. A.	Raucher	ja	nein	nativ	nein	nein	m	50	<55
MUH 10	k. A.	Raucher	ja	nein	nativ	nein	nein	m	49	<55
OPH 1	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	58	55-65
OPH 2	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	w	51	<55
OPH 3	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	50	<55
OPH 4	positiv	anzunehmen	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	64	55-65
OPH 5	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	35	<55
OPH 6	negativ	Raucher	ja	nein	nativ	nein	nein	m	49	<55
OPH 7	negativ	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	62	55-65
OPH 8	negativ	Raucher	nein	ja	behandelt (anderer Tu)	ja	ja	m	56	55-65
OPH 9	k. A.	Raucher	ja	nein	nativ	nein	nein	m	54	<55
OPH 10	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	42	<55
OPH 11	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	53	<55
OPH 12	k. A.	Raucher	ja	nein	nativ	nein	nein	m	61	55-65
OPH 13	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	54	<55
OPH 14	k. A.	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	m	46	<55
OPH 15	k. A.	k. A.	k. A.	ja	bestrahlt (anderer Tumor)	nein	ja	m	63	55-65

Fall nach Lokalisation	HPV	Rauchen	Alkohol-anamnese	vorbehandelt	nativ/vor-behandelt	Chemo-therapie	Radiatio	Geschlecht	Alter	Alters-gruppen
OPH 16	k. A.	k. A.	ja	nein	nativ	nein	nein	m	54	<55
OPH 17	negativ	k. A.	k. A.	nein	nativ	nein	nein	w	68	> 65
OPH 18	negativ	Raucher	ja	nein	nativ	nein	nein	m	59	55-65
OPH 19	k. A.	k. A.	k. A.	ja	behandelt	ja	ja	m	55	55-65
OPH 20	k. A.	k. A.	k. A.	ja	behandelt	ja	ja	m	52	<55
OPH 21	k. A.	k. A.	k. A.	ja	behandelt	ja	ja	m	65	55-65
OPH 22	k. A.	Raucher	k. A.	nein	nativ	nein	nein	w	66	> 65
Kontrolle 1								m	20	<55
Kontrolle 2								w	51	<55
Kontrolle 3								m	48	<55
Kontrolle 4								w	20	<55
Kontrolle 5								m	36	<55
Kontrolle 6								w	31	<55
Kontrolle 7								m	24	<55
Kontrolle 8								m	30	<55
Kontrolle 9								m	30	<55
Kontrolle 11								w	27	<55
Kontrolle 10								m	46	<55
Kontrolle 12								w	27	<55
Kontrolle 13								w	29	<55
Kontrolle 14								m	30	<55
Kontrolle 15								m	42	<55
Kontrolle 16								m	21	<55
Kontrolle 17								m	20	<55
Kontrolle 18								m	21	<55
Kontrolle 19								m	27	<55
Kontrolle 20								w	24	<55
Kontrolle 21								m	24	<55

cp = zytoplasmatisch, n= nukleär, m= membranär, nb = nicht beurteilbar, neg. = negativ, k. A. = keine Angabe, HPH= Hypopharynx, LAR= Larynx, MUH= Mundhöhle, NPH= Nasopharynx, OPH= Oropharynx, SCC= Squamous Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinom), SH= Schleimhaut

Score kumuliert: 1=schwach (Score 1-3), 2= mäßig (Score 4, 6), 3= stark (Score 8, 9, 12)

((+)) = sehr schwach positiv, (+) = schwach positiv, + = einfach positiv, ++ = zweifach positiv, +++ = dreifach positiv

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	ABCC2	ABCC2 +/-	ABCC2 SCORE kumuliert cp	ABCC2 %- Gruppen	ABCC2 %- Gruppe 0-4	ABCC2 SCORE kumuliert	ABCC2 SCORE 0-12	ABCC2 Intensität 0-3	ABCC2 cp/n
NPH 1	Rezidiv	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
HPH 1	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
HPH 2	Primarius	25% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
HPH 3	Rezidiv	20% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
HPH 4	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
HPH 5	Primarius	15% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
HPH 6	Primarius	30% ((+)) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
HPH 7	Primarius	25% + n	positiv		11-50%	2	2	4	2	n
HPH 8	Primarius	90% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n
HPH 9	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
HPH 10	Primarius	20% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
HPH 11	Primarius	70% + n	positiv		51-79%	3	2	6	2	n
HPH 12	Primarius	90% ++ n	positiv		≥ 80%	4	3	12	3	n
HPH 13	Rezidiv	bis 20% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
HPH 14	Rezidiv	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
HPH 15	Primarius	40% + n	positiv		11-50%	2	2	4	2	n
HPH 16	Primarius	80% +-+ n	positiv		≥ 80%	4	3	12	3	n
HPH 17	Primarius	20% + n (heterogen)	positiv		11-50%	2	2	4	2	n
HPH 18	Primarius	50% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
LAR 1	Primarius	20% ((+)) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
LAR 2	Primarius	50% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
LAR 3	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
LAR 4	Primarius	50% + n	positiv		11-50%	2	2	4	2	n
LAR 5	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
LAR 6	Primarius	90% ++ n	positiv		≥ 80%	4	3	12	3	n
LAR 7	Primarius	50% + n	positiv		11-50%	2	2	4	2	n
LAR 8	Rezidiv	30% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
LAR 9	Primarius	70% ++ n	positiv		51-79%	3	3	9	3	n
LAR 10	Primarius	90% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n
LAR 11	Primarius	60% (+) n	positiv		51-79%	3	1	3	1	n
LAR 12	Rezidiv	20% + n	positiv		11-50%	2	2	4	2	n
LAR 13	Rezidiv	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
LAR 14	Primarius	90% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n
LAR 15	Primarius	30% + n	positiv		11-50%	2	2	4	2	n
LAR 16	Primarius	10% (+) n	positiv		≤ 10%	1	1	1	1	n
LAR 17	Primarius	5% (+) n	positiv		≤ 10%	1	1	1	1	n
LAR 18	Primarius	90% ((+)) n	positiv		≥ 80%	4	2	4	1	n
LAR 19	Primarius	30% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
LAR 20	Primarius	30% + n (in basalen Anteilen), 10% auch + cp	positiv	1	11-50%	2	2	4	2	n > cp
LAR 21	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
LAR 22	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
LAR 23	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
LAR 24	Primarius	80% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n
LAR 25	Rezidiv	75% + n	positiv		51-79%	3	2	6	2	n
LAR 26	Primarius	80% ((+)) n	positiv		≥ 80%	4	2	4	1	n
LAR 27	Rezidiv	80% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	ABCC2	ABCC2 +/-	ABCC2 SCORE kumuliert cp	ABCC2 %- Gruppen	ABCC2 %- Gruppe 0-4	ABCC2 SCORE kumuliert	ABCC2 SCORE 0-12	ABCC2 Intensität 0-3	ABCC2 cp/n
LAR 28	Primarius	70% + n	positiv		51-79%	3	2	6	2	n
LAR 29	Primarius	75% (+) n	positiv		51-79%	3	1	3	1	n
LAR 30	Primarius	70% + n	positiv		51-79%	3	2	6	2	n
LAR 31	Primarius	20% + n	positiv		11-50%	2	2	4	2	n
LAR 32	Rezidiv	75% (+) n	positiv		51-79%	3	1	3	1	n
LAR 33	Primarius	80% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n
LAR 34	Rezidiv	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
LAR 35	Primarius	50% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
LAR 36	Primarius	70% + n, teils cp	positiv	k.A.	51-79%	3	2	6	2	n > cp
LAR 37	Primarius	60% (+) m	positiv		51-79%	3	1	3	1	m
LAR 38	Primarius	50% +++ n, ca. 20% + cp, sehr inhomogen	positiv	2	11-50%	2	2	4	2	n > cp
LAR 39	Primarius	80% ++ n	positiv		≥ 80%	4	3	12	3	n
LAR 40	Primarius	90% ++ n	positiv		≥ 80%	4	3	12	3	n
LAR 41	Rezidiv	20% + n	positiv		11-50%	2	2	4	2	n
LAR 42	Primarius	60% (+) n	positiv		51-79%	3	1	3	1	n
LAR 43	Primarius	70% ++ n	positiv		51-79%	3	3	9	3	n
LAR 44	Primarius	70% + n	positiv		51-79%	3	2	6	2	n
LAR 45	Rezidiv	75% + n	positiv		51-79%	3	2	6	2	n
LAR 46	Rezidiv	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
LAR 47	Rezidiv	90% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n
MUH 1	Primarius	70% (+) n	positiv		51-79%	3	1	3	1	n
MUH 2	Primarius	90% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n
MUH 3	Rezidiv	70% + n	positiv		51-79%	3	2	6	2	n
MUH 4	Primarius	90% ++ n	positiv		≥ 80%	4	3	12	3	n
MUH 5	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
MUH 6	Primarius	50% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
MUH 7	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
MUH 8	Primarius	90% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n
MUH 9	Primarius	10% ((+)) n	positiv		≤ 10%	1	1	1	1	n
MUH 10	Primarius	30% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
OPH 1	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
OPH 2	Primarius	20% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
OPH 3	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
OPH 4	Primarius	50% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
OPH 5	Primarius	80% ++ n	positiv		≥ 80%	4	3	12	3	n
OPH 6	Primarius	80% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n
OPH 7	Primarius	60% + n	positiv		51-79%	3	2	6	2	n
OPH 8	Primarius	80% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n
OPH 9	Primarius	60% + n	positiv		51-79%	3	2	6	2	n
OPH 10	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
OPH 11	Primarius	70% + n	positiv		51-79%	3	2	6	2	n
OPH 12	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
OPH 13	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
OPH 14	Primarius	50% (+)-+n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
OPH 15	Rezidiv	50% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
OPH 16	Primarius	75% (+) n	positiv		51-79%	3	1	3	1	n
OPH 17	Primarius	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
OPH 18	Primarius	30% ((+)) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
OPH 19	Rezidiv	80% + n	positiv		≥ 80%	4	3	8	2	n

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	ABCC2	ABCC2 +/-	ABCC2 SCORE kumuliert cp	ABCC2 %- Gruppen	ABCC2 %- Gruppe 0-4	ABCC2 SCORE kumuliert	ABCC2 SCORE 0-12	ABCC2 Intensität 0-3	ABCC2 cp/n
OPH 20	Rezidiv	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
OPH 21	Rezidiv	70% (+) n	positiv		51-79%	3	1	3	1	n
OPH 22	Rezidiv	80% ++ n	positiv		≥ 80%	4	3	12	3	n
Kontrolle 1	Kontrolle	50% (+) n	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
Kontrolle 2	Kontrolle	5% ((+)) n (in respiratorischem Epithel)	positiv		≤ 10%	1	1	1	1	n
Kontrolle 3	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 4	Kontrolle	50% (+) n (Kryptenepithel)	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
Kontrolle 5	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 6	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 7	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 8	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 9	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 11	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 10	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 12	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 13	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 14	Kontrolle	30% (+) n (Kryptenepithel)	positiv		11-50%	2	1	2	1	n
Kontrolle 15	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 16	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 17	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 18	Kontrolle	50% + n	positiv		11-50%	2	2	4	2	n
Kontrolle 19	Kontrolle	80% ((+)) n	positiv		≥ 80%	4	2	4	1	n
Kontrolle 20	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 21	Kontrolle	negativ	negativ		0	0	0	0	0	neg.

cp = zytoplasmatisch, n= nukleär, m= membranär, nb = nicht beurteilbar, neg. = negativ, k. A. = keine Angabe, HPH= Hypopharynx, LAR= Larynx, MUH= Mundhöhle, NPH= Nasopharynx, OPH= Oropharynx, SCC= *Squamous Cell Carcinoma* (Plattenepithelkarzinom), SH= Schleimhaut

Score kumuliert: 1=schwach (Score 1-3), 2= mäßig (Score 4, 6), 3= stark (Score 8, 9, 12)

((+)) = sehr schwach positiv, (+) = schwach positiv, + = einfach positiv, ++ = zweifach positiv, +++ = dreifach positiv

all nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	ABCG2	ABCG2 +/-	ABCG2 %- Gruppen	ABCG2 %- Gruppen 0-4	ABCG2 SCORE kumuliert	ABCG2 SCORE 0-12	ABCG2 Intensität 0-3	ABCG2 cp/n
NPH 1	Rezidiv	10% + c (Interface)	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
HPH 1	Primarius	20% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
HPH 2	Primarius	10% ++ c/m	positiv	≤ 10%	1	1	3	3	cp und n
HPH 3	Rezidiv	60% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
HPH 4	Primarius	70% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
HPH 5	Primarius	70% (+) cp	positiv	51-79%	3	1	3	1	cp
HPH 6	Primarius	20% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
HPH 7	Primarius	25% (+) cp	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp
HPH 8	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
HPH 9	Primarius	30% + cp (betont Front zum Stroma)	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
HPH 10	Primarius	10% + c (Interface)	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
HPH 11	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
HPH 12	Primarius	25% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
HPH 13	Rezidiv	80% + cp	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp
HPH 14	Rezidiv	80% + cp	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp
HPH 15	Primarius	20% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
HPH 16	Primarius	30% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
HPH 17	Primarius	40% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
HPH 18	Primarius	<5 (+) cp	positiv	≤ 10%	1	1	1	1	cp
LAR 1	Primarius	5% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
LAR 2	Primarius	90% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 3	Primarius	10% (+) c (spinozelluläre Schicht)	positiv	≤ 10%	1	1	1	1	cp
LAR 4	Primarius	70% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
LAR 5	Primarius	10% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
LAR 6	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 7	Primarius	30% (+) cp	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp
LAR 8	Rezidiv	70% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
LAR 9	Primarius	75% ++ c (heterogen)	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
LAR 10	Primarius	90% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 11	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 12	Rezidiv	20% (+) cp	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp
LAR 13	Rezidiv	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 14	Primarius	90% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 15	Primarius	60% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
LAR 16	Primarius	ca. 40% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
LAR 17	Primarius	< 5%, Einzelzellen (+) cp	positiv	≤ 10%	1	1	1	1	cp
LAR 18	Primarius	100% + cp	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp
LAR 19	Primarius	50% (+) cp	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp
LAR 20	Primarius	10% (+) cp	positiv	≤ 10%	1	1	1	1	cp
LAR 21	Primarius	40% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
LAR 22	Primarius	80% + cp	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp
LAR 23	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	ABCG2	ABCG2 +/-	ABCG2 %- Gruppen	ABCG2 %- Gruppen 0-4	ABCG2 SCORE kumuliert	ABCG2 SCORE 0-12	ABCG2 Intensität 0-3	ABCG2 cp/n
LAR 24	Primarius	bis 20% ++ c (verhornte Areale)	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
LAR 25	Rezidiv	50% (+)-n und cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp und n
LAR 26	Primarius	75% + cp (teils auch n)	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp > n
LAR 27	Rezidiv	70% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
LAR 28	Primarius	10% ++ cp	positiv	≤ 10%	1	1	3	3	cp
LAR 29	Primarius	30% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
LAR 30	Primarius	5% (+) cp	positiv	≤ 10%	1	1	1	1	cp
LAR 31	Primarius	80% + cp/n (sehr heterogen)	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp und n
LAR 32	Rezidiv	70% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
LAR 33	Primarius	80% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 34	Rezidiv	60% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
LAR 35	Primarius	5% ++ cp/m	positiv	≤ 10%	1	1	3	3	cp und m
LAR 36	Primarius	70% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
LAR 37	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 38	Primarius	5% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
LAR 39	Primarius	80% + - ++ cp (sehr inhomogen)	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 40	Primarius	80% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 41	Rezidiv	15% (+) cp	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp
LAR 42	Primarius	10% ++ cp	positiv	≤ 10%	1	1	3	3	cp
LAR 43	Primarius	80% ++ cp/n	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp und n
LAR 44	Primarius	30% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
LAR 45	Rezidiv	80% + +++	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 46	Rezidiv	20% (+) cp	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp
LAR 47	Rezidiv	90% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
MUH 1	Primarius	< 5%, Einzelzellen positiv	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	k.A.
MUH 2	Primarius	20% (+) cp	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp
MUH 3	Rezidiv	30% (+) cp	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp
MUH 4	Primarius	90% ++ cp/n	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp und n
MUH 5	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
MUH 6	Primarius	90% + cp	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp
MUH 7	Primarius	10% (+) cp	positiv	≤ 10%	1	1	1	1	cp
MUH 8	Primarius	50% ++ c (betont im Interface)	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
MUH 9	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
MUH 10	Primarius	75% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
OPH 1	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
OPH 2	Primarius	10% (+) cp	positiv	≤ 10%	1	1	1	1	cp
OPH 3	Primarius	15% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
OPH 4	Primarius	50% (+) cp	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp
OPH 5	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
OPH 6	Primarius	10% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
OPH 7	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
OPH 8	Primarius	50% ++ c	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
OPH 9	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	ABCG2	ABCG2 +/-	ABCG2 %- Gruppen	ABCG2 %- Gruppen 0-4	ABCG2 SCORE kumuliert	ABCG2 SCORE 0-12	ABCG2 Intensität 0-3	ABCG2 cp/n
OPH 10	Primarius	sehr heterogen, ca. 30% cp (betont in apoptotischen Zellen), gering nukleär	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp und n
OPH 11	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
OPH 12	Primarius	75% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
OPH 13	Primarius	70% (+) cp	positiv	51-79%	3	1	3	1	cp
OPH 14	Primarius	75% (+) cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
OPH 15	Rezidiv	5% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
OPH 16	Primarius	60% ++ cp>n	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp > n
OPH 17	Primarius	10% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
OPH 18	Primarius	50% +++ cp (sehr heterogen)	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
OPH 19	Rezidiv	50% ++ c/m	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp und m
OPH 20	Rezidiv	50% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
OPH 21	Rezidiv	30% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
OPH 22	Rezidiv	sehr inhomogen, 50% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
Kontrolle 1	Kontrolle	Einzelzellen (+)	positiv	≤ 10%	1	1	1	1	k.A.
Kontrolle 2	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 3	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 4	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 5	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 6	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 7	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 8	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 9	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 11	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 10	Kontrolle	Einzelzellen + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
Kontrolle 12	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 13	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 14	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 15	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 16	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 17	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 18	Kontrolle	10% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
Kontrolle 19	Kontrolle	30% (+) cp	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp
Kontrolle 20	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 21	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.

cp = zytoplasmatisch, n= nukleär, m= membranär, nb = nicht beurteilbar, neg. = negativ, k. A. = keine Angabe, HPH= Hypopharynx, LAR= Larynx, MUH= Mundhöhle, NPH= Nasopharynx, OPH= Oropharynx, SCC= Squamous Cell Carcinoma (Platteneithelkarzinom), SH= Schleimhaut

Score kumuliert: 1=schwach (Score 1-3), 2= mäßig (Score 4, 6), 3= stark (Score 8, 9, 12)

((+)) = sehr schwach positiv, (+) = schwach positiv, + = einfach positiv, ++ = zweifach positiv, +++ = dreifach positiv

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	CK19	CK19 +/-	CK19 %- Gruppen	CK19 %- Gruppen 0-4	CK19 SCORE kumuliert	CK19 SCORE 0-12	CK19 Intensität 0-3	CK19 cp/n/m
NPH 1	Rezidiv	90% ++ cp/m im TU, heterogen im OF-Epithel	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp/m
HPH 1	Primarius	15% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
HPH 2	Primarius	75% ++ cp/m	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp/m
HPH 3	Rezidiv	10% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
HPH 4	Primarius	60% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
HPH 5	Primarius	5% + cp TU und Oberflächenepithel	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
HPH 6	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
HPH 7	Primarius	60% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
HPH 8	Primarius	100% +++ cp/m	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp/m
HPH 9	Primarius	60% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
HPH 10	Primarius	60% ++ membranär betont	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp/m
HPH 11	Primarius	80% + cp	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp
HPH 12	Primarius	75% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
HPH 13	Rezidiv	25% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
HPH 14	Rezidiv	100% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
HPH 15	Primarius	20% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
HPH 16	Primarius	98% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
HPH 17	Primarius	80% ++ cp, heterogen	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
HPH 18	Primarius	90% + cp/m	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp/m
LAR 1	Primarius	< 5%, nur Einzelzellen + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
LAR 2	Primarius	< 5%, Einzelzellen schwach +	positiv	≤ 10%	1	1	1	1	cp
LAR 3	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 4	Primarius	80% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 5	Primarius	10% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
LAR 6	Primarius	< 5%, Einzelzellen ++ cp	positiv	≤ 10%	1	1	3	3	cp
LAR 7	Primarius	90% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 8	Rezidiv	100% +++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 9	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 10	Primarius	75% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
LAR 11	Primarius	40% (+) n	positiv	11-50%	2	1	2	1	n
LAR 12	Rezidiv	75% + cp, sehr heterogen	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
LAR 13	Rezidiv	80% ++ cp/m	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp/m
LAR 14	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 15	Primarius	80% +++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 16	Primarius	negativ, (Cis 20% + cp)	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 17	Primarius	75% ++-+++ c	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
LAR 18	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 19	Primarius	< 5%, Einzelzellen +	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
LAR 20	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	CK19	CK19 +/-	CK19 %- Gruppen	CK19 %- Gruppen 0-4	CK19 SCORE kumuliert	CK19 SCORE 0-12	CK19 Intensität 0-3	CK19 cp/n/m
LAR 21	Primarius	75% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
LAR 22	Primarius	negativ (Drüsenausführungsgänge +)	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 23	Primarius	90% ++ m	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	m
LAR 24	Primarius	negativ (Drüsenausführungsgänge +)	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 25	Rezidiv	60% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
LAR 26	Primarius	75% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
LAR 27	Rezidiv	100% +++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 28	Primarius	50% ++ cp	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
LAR 29	Primarius	30% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
LAR 30	Primarius	negativ (im invasiven Tumor)	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 31	Primarius	negativ (normales Epithel +)	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 32	Rezidiv	80% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 33	Primarius	80% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 34	Rezidiv	5% ++ cp	positiv	≤ 10%	1	1	3	3	cp
LAR 35	Primarius	5% ++ cp	positiv	≤ 10%	1	1	3	3	cp
LAR 36	Primarius	80% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 37	Primarius	75% (+) cp	positiv	51-79%	3	1	3	1	cp
LAR 38	Primarius	50% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
LAR 39	Primarius	90% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 40	Primarius	80% +++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp
LAR 41	Rezidiv	100% +++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
LAR 42	Primarius	10% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
LAR 43	Primarius	40% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
LAR 44	Primarius	10% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
LAR 45	Rezidiv	< 5%, Einzelzellen ++ cp (Tumor), (Drüsenausführungsgänge u. Epithel +)	positiv	≤ 10%	1	1	3	3	cp
LAR 46	Rezidiv	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
LAR 47	Rezidiv	90% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
MUH 1	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
MUH 2	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
MUH 3	Rezidiv	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
MUH 4	Primarius	negativ (normales Epithel zum Teil +)	negativ	0	0	0	0	0	neg.
MUH 5	Primarius	20% + cp, luminal	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
MUH 6	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
MUH 7	Primarius	70% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
MUH 8	Primarius	70% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
MUH 9	Primarius	40% ++ cp	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
MUH 10	Primarius	30% + cp, heterogen	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	CK19	CK19 +/-	CK19 %- Gruppen	CK19 %- Gruppen 0-4	CK19 SCORE kumuliert	CK19 SCORE 0-12	CK19 Intensität 0-3	CK19 cp/n/m
OPH 1	Primarius	100 % +++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
OPH 2	Primarius	75% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
OPH 3	Primarius	5-10% + cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
OPH 4	Primarius	80% + -++	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
OPH 5	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
OPH 6	Primarius	75% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
OPH 7	Primarius	negativ (Drüsen +)	negativ	0	0	0	0	0	neg.
OPH 8	Primarius	60% +++ cp (betont im epithelialen Anteil)	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
OPH 9	Primarius	90% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
OPH 10	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
OPH 11	Primarius	80% +++ cp (übriges Epithel inhomogen, schwach +)	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp
OPH 12	Primarius	80% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
OPH 13	Primarius	80% ++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
OPH 14	Primarius	5% ++ cp	positiv	≤ 10%	1	1	2	2	cp
OPH 15	Rezidiv	30% (+) cp	positiv	11-50%	2	1	2	1	cp
OPH 16	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
OPH 17	Primarius	5% (+) cp	positiv	≤ 10%	1	1	1	1	cp
OPH 18	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0	neg.
OPH 19	Rezidiv	90% ++ cp/m	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp/m
OPH 20	Rezidiv	15% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
OPH 21	Rezidiv	70% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
OPH 22	Rezidiv	80% +--- cp	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp
Kontrolle 1	Kontrolle	80% +++ cp	positiv	≥ 80%	4	3	12	3	cp
Kontrolle 2	Kontrolle	100% + cp	positiv	≥ 80%	4	3	8	2	cp
Kontrolle 3	Kontrolle	20% ++ cp (obere Epithelschichten)	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
Kontrolle 4	Kontrolle	25% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
Kontrolle 5	Kontrolle	30% ++ cp	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
Kontrolle 6	Kontrolle	50% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
Kontrolle 7	Kontrolle	40% ++ cp	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
Kontrolle 8	Kontrolle	50% ++ cp	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
Kontrolle 9	Kontrolle	50% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
Kontrolle 11	Kontrolle	50% ++ cp (eher im Krypten-epithel)	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
Kontrolle 10	Kontrolle	60% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
Kontrolle 12	Kontrolle	50% ++ cp	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
Kontrolle 13	Kontrolle	60% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
Kontrolle 14	Kontrolle	40% ++ cp	positiv	11-50%	2	2	6	3	cp
Kontrolle 15	Kontrolle	20% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
Kontrolle 16	Kontrolle	50% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
Kontrolle 17	Kontrolle	10% ++ cp	positiv	≤ 10%	1	1	3	3	cp
Kontrolle 18	Kontrolle	60% ++ cp	positiv	51-79%	3	3	9	3	cp
Kontrolle 19	Kontrolle	50% + cp	positiv	11-50%	2	2	4	2	cp
Kontrolle 20	Kontrolle	70% + cp	positiv	51-79%	3	2	6	2	cp
Kontrolle 21	Kontrolle	10% ++ cp	positiv	≤ 10%	1	1	3	3	cp

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	Ki-67	Ki-67 +/-	Ki-67 %- Gruppen	Ki-67 %- Gruppen 0-4	Ki-67 SCORE kumuliert	Ki-67 SCORE 0-12	Ki-67 Intensität 0-3
NPH 1	Rezidiv	negativ	negativ	0	0	0	0	0
HPH 1	Primarius	5% (+) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
HPH 2	Primarius	15% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
HPH 3	Rezidiv	nb (a.e. falsch negativ)	nb	nb	nb	nb	nb	0
HPH 4	Primarius	nb	nb	nb	nb	nb	nb	0
HPH 5	Primarius	10% ((+)) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
HPH 6	Primarius	5% ((+)) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
HPH 7	Primarius	40% ++ n	positiv	31-50%	3	3	9	3
HPH 8	Primarius	60% + n	positiv	> 50%	4	3	8	2
HPH 9	Primarius	nb	nb	nb	nb	nb	nb	0
HPH 10	Primarius	50% + n	positiv	31-50%	3	2	6	2
HPH 11	Primarius	50% + n	positiv	31-50%	3	2	6	2
HPH 12	Primarius	25% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
HPH 13	Rezidiv	20% + n (fokal)	positiv	11-30%	2	2	4	2
HPH 14	Rezidiv	40% ++ n	positiv	31-50%	3	3	9	3
HPH 15	Primarius	25% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
HPH 16	Primarius	70% ++ n	positiv	> 50%	4	3	12	3
HPH 17	Primarius	25% + n	Positiv	11-30%	2	2	4	2
HPH 18	Primarius	50% + n	Positiv	31-50%	3	2	6	2
LAR 1	Primarius	20% (+) n	positiv	11-30%	2	1	2	1
LAR 2	Primarius	10% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
LAR 3	Primarius	< 5% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
LAR 4	Primarius	40% + n	positiv	31-50%	3	2	6	2
LAR 5	Primarius	15% + n (peripher)	positiv	11-30%	2	2	4	2
LAR 6	Primarius	50% + n	positiv	31-50%	3	2	6	2
LAR 7	Primarius	40% (+) n	positiv	31-50%	3	1	3	1
LAR 8	Rezidiv	25% (+) n	positiv	11-30%	2	1	2	1
LAR 9	Primarius	10% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
LAR 10	Primarius	fehlt	fehlt	nb	nb	nb	nb	0
LAR 11	Primarius	70% + n	positiv	> 50%	4	3	8	2
LAR 12	Rezidiv	nb	nb	nb	nb	nb	nb	0
LAR 13	Rezidiv	nb	nb	nb	nb	nb	nb	0
LAR 14	Primarius	20% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
LAR 15	Primarius	<5 % (+) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
LAR 16	Primarius	10% + n (fokal)	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
LAR 17	Primarius	10% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
LAR 18	Primarius	15% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
LAR 19	Primarius	30% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
LAR 20	Primarius	<5 % + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
LAR 21	Primarius	25% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
LAR 22	Primarius	20% ++ n	positiv	11-30%	2	2	6	3
LAR 23	Primarius	nb	nb	nb	nb	nb	nb	0
LAR 24	Primarius	<5 % ++ n	positiv	≤ 10%	1	1	3	3
LAR 25	Rezidiv	20% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
LAR 26	Primarius	50% ++ n	positiv	31-50%	3	3	9	3
LAR 27	Rezidiv	10% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	Ki-67	Ki-67 +/-	Ki-67 %- Gruppen	Ki-67 %- Gruppen 0-4	Ki-67 SCORE kumuliert	Ki-67 SCORE 0-12	Ki-67 Intensität 0-3
LAR 28	Primarius	50% + n	positiv	31-50%	3	2	6	2
LAR 29	Primarius	10% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
LAR 30	Primarius	< 5 % + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
LAR 31	Primarius	20% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
LAR 32	Rezidiv	20% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
LAR 33	Primarius	40% + n	positiv	31-50%	3	2	6	2
LAR 34	Rezidiv	40% + n	positiv	31-50%	3	2	6	2
LAR 35	Primarius	10% ++ n	positiv	≤ 10%	1	1	3	3
LAR 36	Primarius	50% + n in der Tiefe	positiv	31-50%	3	2	6	2
LAR 37	Primarius	<5% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
LAR 38	Primarius	70% ++ n	positiv	> 50%	4	3	12	3
LAR 39	Primarius	30% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
LAR 40	Primarius	40% + n	positiv	31-50%	3	2	6	2
LAR 41	Rezidiv	30% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
LAR 42	Primarius	20% (+) n	positiv	11-30%	2	1	2	1
LAR 43	Primarius	5% (+) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
LAR 44	Primarius	70% + n	positiv	> 50%	4	3	8	2
LAR 45	Rezidiv	10% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
LAR 46	Rezidiv	10% + n	Positiv	≤ 10%	1	1	2	2
LAR 47	Rezidiv	40% (basal)	Positiv	31-50%	3	2	6	2
MUH 1	Primarius	nb	nb	nb	nb	nb	nb	0
MUH 2	Primarius	20% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
MUH 3	Rezidiv	50% (+) n	positiv	31-50%	3	1	3	1
MUH 4	Primarius	10% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
MUH 5	Primarius	negativ	negativ	0	0	0	0	0
MUH 6	Primarius	nb (a.e. falsch negativ)	nb	nb	nb	nb	nb	0
MUH 7	Primarius	nb	nb	nb	nb	nb	nb	0
MUH 8	Primarius	25% ++ n	positiv	11-30%	2	2	6	3
MUH 9	Primarius	50% ((+)) n	positiv	31-50%	3	1	3	1
MUH 10	Primarius	20% ++ n	Positiv	11-30%	2	2	6	3
OPH 1	Primarius	10% (+) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
OPH 2	Primarius	5-10% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
OPH 3	Primarius	nb	nb	nb	nb	nb	nb	0
OPH 4	Primarius	20% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
OPH 5	Primarius	<5% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
OPH 6	Primarius	15% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
OPH 7	Primarius	5% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
OPH 8	Primarius	50% (+) im spindelzelligen Anteil	positiv	31-50%	3	1	3	1
OPH 9	Primarius	35% + n	positiv	31-50%	3	2	6	2
OPH 10	Primarius	nb	nb	nb	nb	nb	nb	0
OPH 11	Primarius	25% + n (basal)	positiv	11-30%	2	2	4	2
OPH 12	Primarius	7% (+) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
OPH 13	Primarius	nb	nb	nb	nb	nb	nb	0
OPH 14	Primarius	60% + n	positiv	> 50%	4	3	8	2
OPH 15	Rezidiv	40% + n	positiv	31-50%	3	2	6	2
OPH 16	Primarius	50% + n	positiv	31-50%	3	2	6	2
OPH 17	Primarius	nb	nb	nb	nb	nb	nb	0

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	Ki-67	Ki-67 +/-	Ki-67 %- Gruppen	Ki-67 %- Gruppen 0-4	Ki-67 SCORE kumuliert	Ki-67 SCORE 0-12	Ki-67 Intensität 0-3
OPH 18	Primarius	15% + n	positiv	11-30%	2	2	4	2
OPH 19	Rezidiv	50% ++ n	positiv	31-50%	3	3	9	3
OPH 20	Rezidiv	10% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
OPH 21	Rezidiv	70% + n	positiv	> 50%	4	3	8	2
OPH 22	Rezidiv	75% +	Positiv	> 50%	4	3	8	2
Kontrolle 1	Kontrolle	2% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
Kontrolle 2	Kontrolle	1% (+) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
Kontrolle 3	Kontrolle	nb (a.e. falsch negativ)	nb	nb	nb	nb	nb	nb
Kontrolle 4	Kontrolle	negativ	negativ	0	0	0	0	0
Kontrolle 5	Kontrolle	1% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
Kontrolle 6	Kontrolle	10% (+) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
Kontrolle 7	Kontrolle	5% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
Kontrolle 8	Kontrolle	2% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
Kontrolle 9	Kontrolle	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
Kontrolle 11	Kontrolle	nb (a.e. falsch negativ)	nb	nb	nb	nb	nb	nb
Kontrolle 10	Kontrolle	nb (falsch negativ)	nb	nb	nb	nb	nb	nb
Kontrolle 12	Kontrolle	2% (+) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
Kontrolle 13	Kontrolle	1% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
Kontrolle 14	Kontrolle	bis 10% + n (in den Krypten)	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
Kontrolle 15	Kontrolle	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
Kontrolle 16	Kontrolle	2% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
Kontrolle 17	Kontrolle	5% (+) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
Kontrolle 18	Kontrolle	10% + n	positiv	≤ 10%	1	1	2	2
Kontrolle 19	Kontrolle	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
Kontrolle 20	Kontrolle	5% (+) n	positiv	≤ 10%	1	1	1	1
Kontrolle 21	Kontrolle	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb

cp = zytoplasmatisch, n= nukleär, m= membranär, nb = nicht beurteilbar, neg. = negativ, k. A. = keine Angabe, HPH= Hypopharynx, LAR= Larynx, MUH= Mundhöhle, NPH= Nasopharynx, OPH= Oropharynx, SCC= *Squamous Cell Carcinoma* (Plattenepithelkarzinom), SH= Schleimhaut

Score kumuliert: 1=schwach (Score 1-3), 2= mäßig (Score 4, 6), 3= stark (Score 8, 9, 12)

((+)) = sehr schwach positiv, (+) = schwach positiv, + = einfach positiv, ++ = zweifach positiv, +++ = dreifach positiv

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	p53	p53 +/-	p53 cp Ergebnis	p53 SCORE kumuliert cp	p53 %-Gruppen n	p53 %-Gruppen n	p53 SCORE kumuliert n	p53 SCORE 0-12 (n)	p53 Intensität 0-3	p53 cp/n
NPH 1	Rezidiv	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
HPH 1	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
HPH 2	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
HPH 3	Rezidiv	40% + n	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
HPH 4	Primarius	20% + n	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
HPH 5	Primarius	60% (+) n, stärker in tiefen invasiven Nestern	positiv			51-79%	3	1	3	1	n
HPH 6	Primarius	30% (+) n	positiv			11-50%	2	1	2	1	n
HPH 7	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
HPH 8	Primarius	80% ++ n	positiv			≥ 80%	4	3	12	3	n
HPH 9	Primarius	50% (+) n	positiv			11-50%	2	1	2	1	n
HPH 10	Primarius	30% (+) n	positiv			11-50%	2	1	2	1	n
HPH 11	Primarius	50% ((+)) n	positiv			11-50%	2	1	2	1	n
HPH 12	Primarius	60% + n	positiv			51-79%	3	2	6	2	n
HPH 13	Rezidiv	30% + n (schwach cp)	positiv	30% cp (+)	2	11-50%	2	2	4	2	n > cp
HPH 14	Rezidiv	80% ++ n (+ basale Epithelien)	positiv			≥ 80%	4	3	12	3	n
HPH 15	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
HPH 16	Primarius	90% ++ n	positiv			≥ 80%	4	3	12	3	n
HPH 17	Primarius	negativ (nukleär), 60% (+) cp	positiv	60% cp (+)	3	0	0	0	0	1	cp
HPH 18	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 1	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 2	Primarius	80% ++ n	positiv			≥ 80%	4	3	12	3	n
LAR 3	Primarius	negativ (15% Cis und basale Ep.)	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 4	Primarius	50% +	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
LAR 5	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 6	Primarius	< 5% + n	positiv			≤ 10%	1	1	2	2	n
LAR 7	Primarius	75% + n	positiv			51-79%	3	2	6	2	n
LAR 8	Rezidiv	75% + n	positiv			51-79%	3	2	6	2	n
LAR 9	Primarius	80% ++ n (schwach c)	positiv	80% cp (+)	4	≥ 80%	4	3	12	3	n
LAR 10	Primarius	70% ++ n	positiv			51-79%	3	3	9	3	n
LAR 11	Primarius	40% (+) n	positiv			11-50%	2	1	2	1	n
LAR 12	Rezidiv	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 13	Rezidiv	25% ++ n (betont Ulkusgrund, heterogen)	positiv			11-50%	2	2	6	3	n
LAR 14	Primarius	negativ (viel Hintergrund)	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 15	Primarius	80% +++ n	positiv			≥ 80%	4	3	12	3	n
LAR 16	Primarius	30% + n (Front)	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
LAR 17	Primarius	20% ++ n (Invasionsfront)	positiv			11-50%	2	2	6	3	n
LAR 18	Primarius	70% + n	positiv			51-79%	3	2	6	2	n
LAR 19	Primarius	50% + n	positiv			11-50%	2	2	4	2	n

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	p53	p53 +/-	p53 cp Ergebnis	p53 SCORE kumuliert cp	p53 %-Gruppen n	p53 %-Gruppen n	p53 SCORE kumuliert n	p53 SCORE 0-12 (n)	p53 Intensität 0-3	p53 cp/n
LAR 20	Primarius	20% (+) n	positiv			11-50%	2	1	2	1	n
LAR 21	Primarius	30% +++ n (Front)	positiv			11-50%	2	2	6	3	n
LAR 22	Primarius	20% n +++ (Front) u. Epithel	positiv			11-50%	2	2	6	3	n
LAR 23	Primarius	75% ++ n	positiv			51-79%	3	3	9	3	n
LAR 24	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 25	Rezidiv	negativ, (30% + n Cis, basale Ep.)	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 26	Primarius	80% ++ n (viel Hintergrund)	positiv			≥ 80%	4	3	12	3	nb
LAR 27	Rezidiv	50% + n (viel Hintergrund)	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
LAR 28	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 29	Primarius	60% ++ n (peripherer Saum, Nester)	positiv			51-79%	3	3	9	3	n
LAR 30	Primarius	40% + n (heterogen)	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
LAR 31	Primarius	90% ++ n (normales Epithel negativ!)	positiv			≥ 80%	4	3	12	3	n
LAR 32	Rezidiv	75% ++ n	positiv			51-79%	3	3	9	3	n
LAR 33	Primarius	negativ, (30% + n im Cis)	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 34	Rezidiv	30% + n (viel Hintergrund)	positiv			11-50%	2	2	4	2	nb
LAR 35	Primarius	negativ (viel Hintergrund)	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 36	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 37	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 38	Primarius	5% + n	positiv			≤ 10%	1	1	2	2	n
LAR 39	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 40	Primarius	60% ++ n	positiv			51-79%	3	3	9	3	n
LAR 41	Rezidiv	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 42	Primarius	60% + n	positiv			51-79%	3	1	3	nb	nb
LAR 43	Primarius	10% + n	positiv			≤ 10%	1	1	2	2	n
LAR 44	Primarius	70% ++ n (heterogen)	positiv			51-79%	3	3	9	3	n
LAR 45	Rezidiv	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
LAR 46	Rezidiv	30% (+) n	positiv			11-50%	2	1	2	1	n
LAR 47	Rezidiv	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
MUH 1	Primarius	10% (+) n	positiv			≤ 10%	1	1	1	1	n
MUH 2	Primarius	50% + n	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
MUH 3	Rezidiv	50% + n	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
MUH 4	Primarius	80% + n	positiv			≥ 80%	4	3	8	2	n
MUH 5	Primarius	75% + n	positiv			51-79%	3	2	6	2	n
MUH 6	Primarius	90% +++ n	positiv			≥ 80%	4	3	12	3	n
MUH 7	Primarius	75% + n	positiv			51-79%	3	2	6	2	n
MUH 8	Primarius	90% + n	positiv			≥ 80%	4	3	8	2	n
MUH 9	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
MUH 10	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
OPH 1	Primarius	70% + n	positiv			51-79%	3	2	6	2	n

Fall nach Lokalisation	Primarius/ Rezidiv	p53	p53 +/-	p53 cp Ergebnis	p53 SCORE kumuliert cp	p53 %-Gruppen n	p53 %-Gruppen n	p53 SCORE kumuliert n	p53 SCORE 0-12 (n)	p53 Intensität 0-3	p53 cp/n
OPH 2	Primarius	60% ++ n (v.a. in tiefen pleomorphen soliden Tumorteilen)	positiv			51-79%	3	3	9	3	n
OPH 3	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
OPH 4	Primarius	30% + n	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
OPH 5	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
OPH 6	Primarius	10% + n (v.a. Front zur Tiefe)	positiv			≤ 10%	1	1	2	2	n
OPH 7	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
OPH 8	Primarius	60% ++ n, ca. 50% + c	positiv	50% cp+	4	51-79%	3	3	9	3	n + cp
OPH 9	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
OPH 10	Primarius	15% ++ n	positiv			11-50%	2	2	6	3	n
OPH 11	Primarius	25% + n (v.a. Front zur Tiefe)	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
OPH 12	Primarius	80% + n	positiv			≥ 80%	4	3	8	2	n
OPH 13	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
OPH 14	Primarius	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
OPH 15	Rezidiv	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
OPH 16	Primarius	75% ++ n	positiv			51-79%	3	3	9	3	n
OPH 17	Primarius	20% + n	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
OPH 18	Primarius	50% (+) n	positiv			11-50%	2	1	2	1	n
OPH 19	Rezidiv	90% ++ n (Ca/Cis)	positiv			≥ 80%	4	3	12	3	n
OPH 20	Rezidiv	60% (+) n	positiv			51-79%	3	1	3	1	n
OPH 21	Rezidiv	50% + n	positiv			11-50%	2	2	4	2	n
OPH 22	Rezidiv	75% ++ n	positiv			51-79%	3	3	9	3	n
Kontrolle 1	Kontrolle	30% (+) n	positiv			11-50%	2	1	2	1	n
Kontrolle 2	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 3	Kontrolle	50% (+) n in basalen Epithelien	positiv			11-50%	2	1	2	1	n
Kontrolle 4	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 5	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 6	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 7	Kontrolle	10% (+) n	positiv			≤ 10%	1	1	1	1	n
Kontrolle 8	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 9	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 11	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 10	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 12	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 13	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 14	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 15	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 16	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 17	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 18	Kontrolle	10% (+) n	positiv			≤ 10%	1	1	1	1	n
Kontrolle 19	Kontrolle	75% + n	positiv			51-79%	3	2	6	2	n
Kontrolle 20	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.
Kontrolle 21	Kontrolle	negativ	negativ			0	0	0	0	0	neg.

Tabelle 11. Verteilung von Rezidiv und Primarius im Kollektiv

<i>Rezidiv</i>	<i>Anzahl Fälle</i>	<i>Fälle in Prozent</i>	<i>Anzahl in 98</i>	<i>Prozent von 98</i>
<i>ja</i>	25	23,4%	21	21,4%
<i>nein</i>	82	76,6%	77	78,6%
<i>Rezidiv und Primariusprobe</i>	9	8,4%		
<i>Nur Rezidivprobe</i>	16	15%	16	16,3%
<i>Nur Primariusprobe</i>	73	68,2%	73	74,5%
<i>gesamt</i>	107	100%		

Tabelle 12. Rezidive und Primarien – nicht in 98 Fällen enthalten

<i>Primarius/Rezidiv</i>	<i>Kategorie</i>	<i>Anzahl Fall</i>	<i>Anteil von Gesamt (%)</i>
<i>Rezidiv – nicht erfasst</i>	3 (LAR 1) Rezidiv	1	
	20 (MUH 2) Rezidiv	1	
	37 (OPH 7) Rezidiv	1	
	83 (MUH 8) Rezidiv	1	
<i>Rezidiv – n. e. gesamt</i>		4	45%
<i>Primarius – nicht erfasst</i>	24 (Larynx 13) Primarius	1	
	52 (Larynx 27) Primarius (R)	1	
	65 (NPH 1) Primarius	1	
	81 (Larynx 41) Primarius (R)	1	
	93 (Larynx 46) Primarius (R)	1	
<i>Primarius – n. e. gesamt</i>		5	55%
Gesamt		98	100%

In Tabelle 12 sind die 9 Präparate der 107 Präparate dargestellt, die in den stochastisch ermittelten 98 Proben nicht erfasst (n. e.) werden. (R) markiert die bestätigten Raucher.

Tabelle 13. Übersicht über die Rezidiv-Primarius-Sets

Fallnummer	Rezidiv/ Primarius	Ursprung (Primarius)	Probeentnahmeort	TNM	Grading	Alter [a]	Geschlecht
3 (Larynx 1)	Primarius	Larynx	Stimm lippe rechts	T1N0Mx	G2	54	m
	Rezidiv		Stimm lippe rechts				
20 (MUH 2)	Primarius	Mundhöhle	Zungenunterseite/ Mundboden	T1N0M0	G2	77	w
	Rezidiv		Pallatum molle re., ant., ZR re	T4N0M0			
24 (Larynx 13)	Primarius	Larynx	Stimm lippe	pT1N0M0	G2	76	m
	Rezidiv		subglottisch li.	rpT3N0M0P n1 V1		78, 76 bei ED	
37 (OPH 7)	Primarius	Oropharynx	OPH, breit infiltr.: Mundboden, Kiefer, weicher Gaumen	T4N0M0	G2	62	m
	Rezidiv - Z. n. RCT		NPH			64, 62 bei ED	
52 (Larynx 27) (R)	Primarius	Larynx	Stimm lippe li	T1N0M0	G2	68	m
	Rezidiv		Stimm lippe li.				
*65 (NPH 1)	„Primarius“ – bestrahlt, CUP in Anamnese	Nasopharynx	Nasopharynx	k. A.	G2	53	w
	Rezidiv - Z. n. RCT		Nasopharynx				
**81 (Larynx 41) (R)	Primarius	Larynx	supraglottisch re.	T1N0Mx, V0	G2	59	w
	Rezidiv		Stimm lippe li.	T4aN0Mx		61, 59 bei ED	
83 (MUH 8) r	Primarius	Mundhöhle	Gaumensegel re., weicher Gaumen	T1N0M0	G3	50	m
	Rezidiv		OPH				
93 (Larynx 46) (R)	Primarius	Larynx	Stimm lippe	T1aN0M0	G1	58	m
	Rezidiv		Stimm lippe, vordere Kommissur				
Summe n=9	n=18						

In Tabelle 13 sind die 9 Fälle aufgelistet, in denen mehrere Präparate als Rezidiv und Primarius-Paar vorlagen. Insgesamt lagen in 9 Fällen 18 Präparate mit je 1 Rezidiv und Primarius pro Fall vor. (R) markiert die bestätigten Raucher.

*Bei Fall NPH1 handelt es sich um einen schweren Verlauf mit sehr aggressivem Tumor: Vorgeschichte mit CUP bei Hirnmetastase. 08-09/2008 Ganzhirnbestrahlung nach Metastasen-Resektion. 03/2009 Sicherung Nasopharynxkarzinom mittels Probeexzision (PE) (ED, Primariusprobe), palliative Radiochemotherapie mit Cisplatin als individueller Heilversuch. 10/2009 Rezidiv im Hypopharynx, Zweitlinien Chemotherapie: 5 Zyklen Carboplatin, Cetuximab bis 4/2010. 5/2010 Progress mit diffuser ossärer und hepatischer Metastasierung. Danach liegen keine Daten mehr zu diesem Fall vor. Es ist von einem baldigen Versterben nach Beendigung der tumorspezifischen Therapie und Progress unter dieser auszugehen. ** Pat. Lebt 2017 noch, ED 2009

Tabelle 14. ABCC2 – Übersichtstabelle Immunhistochemie Korrelation – Anzahl

		ABCC2 Anzahl (N)						
	Score	Alle pos.	0 = neg.	1 (1-3)	2 (4-6)	3 (8-12)	Score >3	Summe
Alle	HNSCC	76	22	30	24	22	46	98
Kontrollen	Kontrollen	6	15	4	2	0	2	21
Geschlecht	männlich	66	18	26	22	18	40	84
	weiblich	10	4	4	2	4	6	14
Kontrollen	K männlich	4	10	2	2	0	2	14
	K weiblich	2	5	2	0	0	0	7
Alter	<55	22	8	12	5	5	10	30
	55-65	31	7	12	10	9	19	38
	>65	23	7	6	9	8	17	30
Kontrollen	K <55	6	15	4	2	0	2	21
	K 55-65	0	0	0	0	0	0	0
	K >65	0	0	0	0	0	0	0
Prim/Rez	Primarius	61	16	24	19	18	37	77
	Rezidiv	15	6	6	5	4	9	21
Kontrollen	Kontrollen	6	15	4	2	0	2	21
Lokalisation	Mundhöhle	8	2	4	1	3	4	10
	Pharynx	29	12	14	7	8	15	41
	MUH/PHA	37	14	18	8	11	19	51
	Larynx	39	8	12	16	11	27	47
Kontrollen	K MUH	0	0	0	0	0	0	0
	K Pharynx	6	15	4	2	0	2	21
	K Larynx	0	0	0	0	0	0	0
T	T1	26	6	13	8	5	13	32
	T2	24	5	6	7	11	18	29
	T3-4	24	10	10	9	5	14	34
Kontrollen	Kontrollen	6	15	4	2	0	2	21
Grading	G1	6	2	5	1		1	8
	G2	58	15	18	20	20	40	73
	G3	12	5	7	3	2	5	17
Kontrollen	Kontrollen	6	15	4	2	0	2	21
N	N0	35	11	14	11	10	21	46
	N+	35	8	14	11	10	21	43
Kontrollen	Kontrollen	6	15	4	2	0	2	21
ck19	Ck 19 -	18	4	6	6	6	12	22
	Ck 19 +	58	18	24	18	16	34	76
Kontrollen	K Ck 19 -	0	0	0	0	0	0	0
	K Ck 19 +	6	15	4	2	0	2	21
p53	p53 -	25	6	9	10	6	16	31
	p53 +	51	16	21	14	16	30	67
Kontrollen	K p53 -	3	13	3	0	0	0	16
	K p53 +	3	2	1	2	0	2	5
ki67	ki67 -	0	2	0	0	0	0	2
	ki67 +	71	11	27	23	21	44	82
Kontrollen	K ki67 -	1	0	1	0	0	0	1
	K ki67 +	4	9	3	1	0	1	13

Tabelle 15. Nukleozytoplasmatische Verteilung von ABCC2

Nukleozytoplasmatische Lokalisation	Anzahl Fälle (nur Positive)	Anzahl von Positiv [%]	Anzahl von 98 [%]
cytoplasmatisch (cp)	0	0%	0%
nukleär (n)	72	94,7%	73,5%
membranär (m)	1	1,3%	1%
n > cp	3	3,9%	3,1%
gesamt	76	76 = 100%	98 = 100%

Tabelle 16. ABCG2 – Übersichtstabelle Immunhistochemie Korrelation – Anzahl

		ABCG2 Anzahl (N)						
	Score	Alle pos.	0 = neg.	1 (1-3)	2 (4-6)	3 (8-12)	Score >3	Summe
Alle	HNSCC	84	14	32	32	20	52	98
Kontrollen	Kontrollen	4	17	4	0	0	0	21
Geschlecht	männlich	71	13	25	29	17	46	84
	weiblich	13	1	7	3	3	6	14
Kontrollen	K männlich	4	10	4	0	0	0	14
	K weiblich	0	7	0	0	0	0	7
Alter	<55	24	6	9	9	6	15	30
	55-65	31	7	14	13	4	17	38
	>65	29	1	9	10	10	20	30
Kontrollen	K <55	4	17	4	0	0	0	21
	K 55-65	0	0	0	0	0	0	0
	K >65	0	0	0	0	0	0	0
Prim/Rez	Primarius	64	13	26	22	16	38	77
	Rezidiiv	20	1	6	10	4	14	21
Kontrollen	Kontrollen	4	17	4	0	0	0	21
Lokalisation	Mundhöhle	8	2	4	2	2	4	10
	Pharynx	34	7	13	17	4	21	41
	MUH/PHA	42	9	17	19	6	25	51
	Larynx	42	5	15	13	14	27	47
Kontrollen	K MUH	0	0	0	0	0	0	0
	K Pharynx	4	17	4	0	0	0	21
	K Larynx	0	0	0	0	0	0	0
T	T1	26	6	15	6	5	11	32
	T2	24	5	6	13	5	18	29
	T3-4	31	3	10	13	8	21	34
Kontrollen	Kontrollen	4	17	4	0	0	0	21
Grading	G1	7	1	3	4		4	8
	G2	63	10	23	22	18	40	73
	G3	14	3	6	6	2	8	17
Kontrollen	Kontrollen	4	17	4	0	0	0	21
N	N0	37	9	18	14	5	19	46
	N+	38	5	11	16	11	27	43
Kontrollen	Kontrollen	4	17	4	0	0	0	21
ck19	Ck 19 -	20	2	8	4	8	12	22
	Ck 19 +	64	12	24	28	12	40	76
Kontrollen	K Ck 19 -	0	0	0	0	0	0	0
	K Ck 19 +	4	17	4	0	0	0	21
p53	p53 -	26	5	13	7	6	13	31
	p53 +	58	9	19	25	14	39	67
Kontrollen	K p53 -	1	15	1	0	0	0	16
	K p53 +	3	2	3	0	0	0	5
ki67	ki67 -	1	1	1			0	2
	ki67 +	71	11	25	29	17	46	82
ki67	K ki67 -	0	1	0	0	0	0	1
Kontrollen	K ki67 +	2	11	2	0	0	0	13

Tabelle 17. Nukleozytoplasmatische Verteilung von ABCG2

Nukleozytoplasmatische Lokalisation	Anzahl Fälle (nur Positive)	Anzahl von Positiv [%]	Anzahl von 98 [%]
zytoplasmatisch (cp)	73	88%	74,5%
nukleär (n)	0	0%	0%
cp und n	8	9,6%	8,2%
cp und m	2	2,4%	2%
gesamt	83	83 = 100%	98 = 100%

Tabelle 18. CK19 – Übersichtstabelle Immunhistochemie Korrelation – Anzahl

Parameter	Subgruppe	CK19 Anzahl (N)						Summe
		Alle pos.	0 = neg.	1 (1-3)	2 (4-6)	3 (8-12)	Score >3	
Alle	HNSCC	75	23	18	16	41	57	98
Kontrollen	Kontrollen	21	0	2	15	4	19	21
Geschlecht	männlich	63	21	15	14	34	48	84
	weiblich	12	2	3	2	7	9	14
Kontrollen	K männlich	14	0	2	10	2	12	14
	K weiblich	7	0	0	5	2	7	7
Alter	<55	21	9	4	7	10	17	30
	55-65	30	8	8	4	18	22	38
	>65	24	6	6	5	13	18	30
Kontrollen	K <55	21	0	2	15	4	19	21
	K 55-65	0	0	0	0	0	0	0
	K >65	0	0	0	0	0	0	0
Prim/Rez	Primarius	56	21	14	12	30	42	77
	Rezidiv	19	2	4	4	11	15	21
Kontrollen	Kontrollen	21	0	2	15	4	19	21
Lokalisation	Mundhöhle	5	5	0	3	2	5	10
	Pharynx	34	7	6	8	20	28	41
	Larynx	36	11	12	5	19	24	47
Kontrollen	K MUH	0	0	0	0	0	0	0
	K Pharynx	21	0	2	15	4	19	21
	K Larynx	0	0	0	0	0	0	0
T	T1	26	6	11	6	9	15	32
	T2	20	9	1	3	16	19	29
	T3-4	27	7	6	7	14	21	34
Kontrollen	Kontrollen	21	0	2	15	4	19	21
Grading	G1	5	3	2	2	1	3	8
	G2	53	20	12	10	31	41	73
	G3	17	0	4	4	9	13	17
Kontrollen	Kontrollen	21	0	2	15	4	19	21
N	N0	35	11	13	6	16	22	46
	N+	34	9	4	9	21	30	43
Kontrollen	Kontrollen	21	0	2	15	4	19	21

Tabelle 19. Nukleozytoplasmatische Verteilung von CK19

Nukleozytoplasmatische Lokalisation	Anzahl Fälle (nur Positive)	Anzahl von Positiv [%]	Anzahl von 98 [%]
<i>cytoplasmatisch (cp)</i>	67	88,2%	68,4%
<i>nukleär (n)</i>	1	1,3%	1%
<i>membranär (m)</i>	1	1,3%	1%
<i>cp und m</i>	7	9,2%	7,1%
<i>gesamt</i>	76	76 = 100%	98 = 100%

Tabelle 20. Ki-67 – Übersichtstabelle Immunhistochemie Korrelation – Anzahl

		ki67 Anzahl (N)							
Parameter	Subgruppe	Alle pos.	0 = neg.	1 (1-3)	2 (4-6)	3 (8-12)	0-3	Score >3	Summe
Alle	HNSCC	82	2	33	37	12	35	49	84
Kontrollen	Kontrollen	13	1	13	0	0	14	0	14
Geschlecht	männlich	74	0	32	33	9	32	42	74
	weiblich	8	2	1	5	2	3	7	10
Kontrollen	K männlich	8	0	8	0	0	8	0	8
	K weiblich	5	1	5	0	0	6	0	6
Alter	<55	24	2	11	12	1	13	13	26
	55-65	34	0	13	16	5	13	21	34
	>65	24	0	9	10	5	9	15	24
Kontrollen	K <55	13	1	13	0	0	14	0	14
	K 55-65	0	0	0	0	0	0	0	0
	K >65	0	0	0	0	0	0	0	0
Prim/Rez	Primarius	65	1	27	31	7	28	38	66
	Rezidiv	17	1	6	7	4	7	11	18
Kontrollen	Kontrollen	13	1	13	0	0	14	0	14
Lokalisation	Mundhöhle	6	1	3	3	0	4	3	7
	Pharynx	33	1	10	16	7	11	23	34
	Larynx	43	0	20	19	4	20	23	43
Kontrollen	K MUH	0	0	0	0	0	0	0	0
	K Pharynx	13	1	13	0	0	14	0	14
	K Larynx	13	1	13	0	0	0	0	14
T	T1	29	0	15	11	3	15	14	29
	T2	27	1	10	12	5	11	17	28
	T3-4	24	0	8	13	3	8	16	24
Kontrollen	Kontrollen	13	1	13	0	0	14	0	14
Grading	G1	8	0	7	1	0	7	1	8
	G2	60	2	22	29	9	24	38	62
	G3	14	0	4	8	2	4	10	14
Kontrollen	Kontrollen	13	1	13	0	0	14	0	14
N	N0	41	1	21	15	5	22	20	42
	N+	35	0	11	19	5	11	24	35
Kontrollen	Kontrollen	13	1	13	0	0	14	0	14

Tabelle 21. Nukleozytoplasmatische Verteilung von p53

Nukleozytoplasmatische Lokalisation	Anzahl Fälle positiv	Fälle in Prozent	Anzahl von 98 [%]
cp	1	1,5%	1%
n	61	91%	62,2%
n + cp	2	3%	2%
nb	3	4,5%	3,1%
gesamt	67	100%	

Tabelle 22. p53 – Übersichtstabelle Immunhistochemie Korrelation – Anzahl

Parameter	Subgruppe	p53 Anzahl (N)						Summe
		Alle pos.	0 = neg.	1 (1-3)	2 (4-6)	3 (8-12)	Score >3	
Alle	HNSCC	66	32	16	27	23	50	98
Kontrollen	Kontrollen	5	16	4	1	0	1	21
Geschlecht	männlich	55	29	15	21	19	40	84
	weiblich	11	3	1	6	4	10	14
Kontrollen	K männlich	5	9	4	1	0	1	14
	K weiblich	0	7	0	0	0	0	7
Alter	<55	18	12	2	9	7	16	30
	55-65	27	11	11	10	6	16	38
	>65	21	9	3	8	10	18	30
Kontrollen	K <55	5	16	4	1	0	1	21
	K 55-65	0	0	0	0	0	0	0
	K >65	0	0	0	0	0	0	0
Prim/Rez	Primarius	52	25	14	19	19	38	77
	Rezidiv	14	7	2	8	4	12	21
Kontrollen	Kontrollen	5	16	4	1		1	21
Lokalisation	Mundhöhle	8	2	1	4	3	7	10
	Pharynx	27	14	8	10	9	19	41
	Larynx	31	16	7	13	11	24	47
Kontrollen	K MUH	0	0	0	0	0	0	0
	K Pharynx	5	16	4	1	0	1	21
	K Larynx	0	0	0	0	0	0	0
T	T1	22	10	8	9	5	14	32
	T2	18	11	3	6	9	15	29
	T3-4	25	9	5	12	8	20	34
Kontrollen	Kontrollen	5	16	4	1	0	1	21
Grading	G1	5	3	2	1	2	3	8
	G2	50	23	9	22	19	41	73
	G3	11	6	5	4	2	6	17
Kontrollen	Kontrollen	5	16	4	1	0	1	21
N	N0	30	16	7	15	8	23	46
	N+	31	12	9	10	12	22	43
Kontrollen	Kontrollen	5	16	4	1	0	1	21

Tabelle 23. ABCG2 Expression in HNSCC mit Ki-67 Score >3 vs. 0-3

ABCG2	Ki-67 Score >3	Ki-67 Score <3	gesamt
Färbung +	43	29	72
Färbung -	6	6	12
gesamt	49	35	84

Die Kreuztabelle zeigt das Verhältnis der ABCG2 positiven und negativen HNSCC unter Berücksichtigung des Grenzwerts für ein positives Ergebnis von Ki-67 ab einem Score >3. Auch unter diesen Bedingungen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der ABCG2-Expression bei Ki-67 „+“ und Ki-67 „-“ HNSCC (p=0,527; Chi-Quadratstest)

Tabelle 24. CK19 Score <8 vs. 8-12 – Korrelation mit Grading G

CK19	G1	G2	G3	gesamt
Score 8-12	1	31	9	41
Score < 8	7	42	8	57
gesamt	8	73	17	98

Die Kreuztabelle zeigt das Verhältnis der CK19 „positiven“ und „negativen“ HNSCC unter Berücksichtigung des Grenzwerts für ein positives Ergebnis ab einem starken CK19-Färberegebnis (Score 8-12). Unter diesen Bedingungen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der CK19-Expression in Abhängigkeit vom Grading (p=0,178; Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 25. Ki-67 Score >3 vs. 0-3 – Primarius und Rezidiv

	Primarius	Rezidiv	gesamt
Ki-67 Score >3	38	11	49
Ki-67 Score <3	28	7	35
gesamt	66	18	84

Die Kreuztabelle zeigt das Verhältnis der Ki-67 positiven und negativen HNSCC unter Berücksichtigung des Grenzwerts für ein positives Ergebnis von Ki-67 ab einem Score >3 (siehe auch Kapitel 4.2.4). Auch unter diesen Bedingungen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,787$; Chi-Quadratstest).

Tabelle 26. ABCC2 Expression in HNSCC – Vergleich Vortherapie ja/nein (Anzahl n)

ABCC2	Vortherapie	Keine Vortherapie	gesamt
negativ	4	18	22
positiv	8	68	76
Score 1-3	5	25	30
Score 4-6	1	23	24
Score 8-12	2	20	22
gesamt	12	86	98

Die erweiterte Kreuztabelle zeigt das Verhältnis der ABCC2 Expression in vorbehandelten und nicht vorbehandelten HNSCC. Es ergaben sich weder im Positiv-/Negativvergleich ($p=0,458$), noch bei Betrachtung der Ausprägung der positiven Ergebnisse (Scoring; $p=0,325$ (ohne negative Ergebnisse)) statistisch signifikante Unterschiede (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 27. ABCG2 Expression in HNSCC – Vergleich Vortherapie ja/nein (Anzahl n)

ABCG2	Vortherapie	Keine Vortherapie	gesamt
negativ	1	13	14
positiv	11	73	84
Score 1-3	3	29	32
Score 4-6	6	26	32
Score 8-12	2	18	20
gesamt	12	86	98

Die erweiterte Kreuztabelle zeigt das Verhältnis der ABCG2 Expression in vorbehandelten und nicht vorbehandelten HNSCC. Es ergaben sich weder im Positiv-/Negativvergleich ($p=1,0$), noch bei Betrachtung der Ausprägung der positiven Ergebnisse (Scoring; $p=0,557$ (ohne negative Ergebnisse)) statistisch signifikante Unterschiede (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 28. Ki-67 Expression in HNSCC – Vergleich Vortherapie ja/nein (Anzahl n)

Ki-67	Vortherapie	Keine Vortherapie	gesamt
negativ	1	1	2
positiv	8	74	82
Score 1-3	3	30	33
Score 4-6	3	34	37
Score 8-12	2	10	12
gesamt	9	75	84

Die erweiterte Kreuztabelle zeigt das Verhältnis der Ki-67 Expression in vorbehandelten und nicht vorbehandelten HNSCC. Es ergaben sich weder im Positiv-/Negativvergleich ($p=0,204$), noch bei Betrachtung der Ausprägung der positiven Ergebnisse (Scoring; $p=0,772$ (ohne negative Ergebnisse)) statistisch signifikante Unterschiede (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 29. CK19 Expression in HNSCC – Vergleich Vortherapie ja/nein (Anzahl n)

CK19	Vortherapie	Keine Vortherapie	gesamt
negativ	2	20	22
positiv	10	66	76
Score 1-3	3	15	18
Score 4-6	3	13	16
Score 8-12	4	38	42
gesamt	12	86	98

Die erweiterte Kreuztabelle zeigt das Verhältnis der CK19 Expression in vorbehandelten und nicht vorbehandelten HNSCC. Es ergaben sich weder im Positiv-/Negativvergleich ($p=1,0$), noch bei Betrachtung der Ausprägung der positiven Ergebnisse (Scoring; $p=0,478$ (ohne negative Ergebnisse)) statistisch signifikante Unterschiede (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 30. p53 Expression in HNSCC – Vergleich Vortherapie ja/nein (Anzahl n)

p53	Vortherapie	Keine Vortherapie	gesamt
negativ	2	30	32
positiv	10	56	66
Score 1-3	1	15	16
Score 4-6	6	21	27
Score 8-12	3	20	23
gesamt	12	86	98

Die erweiterte Kreuztabelle zeigt das Verhältnis der p53 Expression in vorbehandelten und nicht vorbehandelten HNSCC. Es ergaben sich weder im Positiv-/Negativvergleich ($p=0,327$), noch bei Betrachtung der Ausprägung der positiven Ergebnisse (Scoring; $p=0,383$ (ohne negative Ergebnisse)) statistisch signifikante Unterschiede (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher).

9 GRAPHISCHER ANHANG

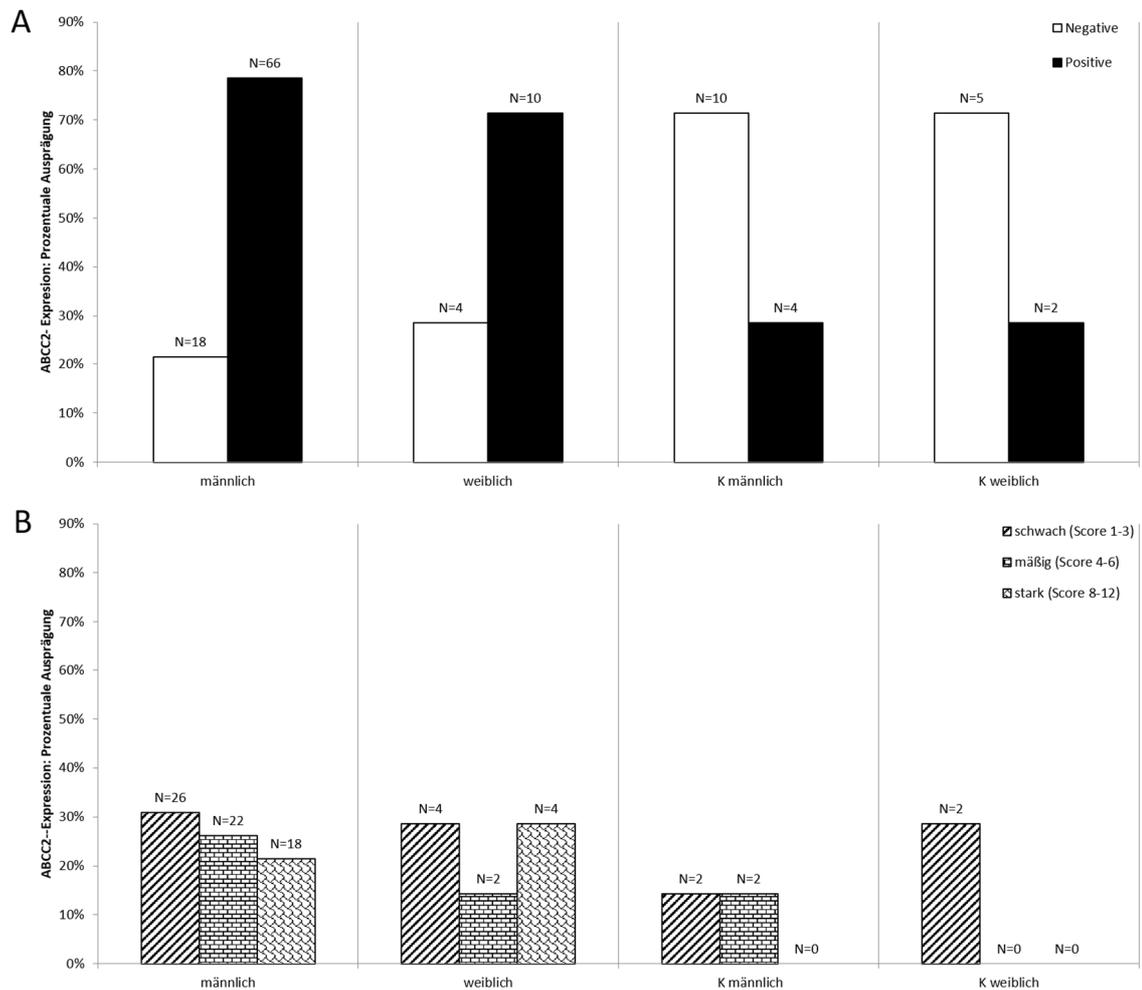


Abbildung 36. ABCC2 Expression – Korrelation mit Geschlecht

A: Verhältnis von ABCC2 positiven und negativen Proben in HNSCC (männlich, weiblich) und Kontrollen (K männlich, K weiblich).
B: Differenzierung der ABCC2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. weiblich).

Unter Anwendung der Kontingenztabellenanalyse und des erweiterten Exakten Tests nach Fisher ergab sich kein beobachtbarer und insbesondere kein statistisch signifikanter Unterschied in der ABCC2-Expression in HNSCC in Abhängigkeit vom Geschlecht (A: $p=0,510$; B: $p=0,574$ (ohne negative Ergebnisse)).

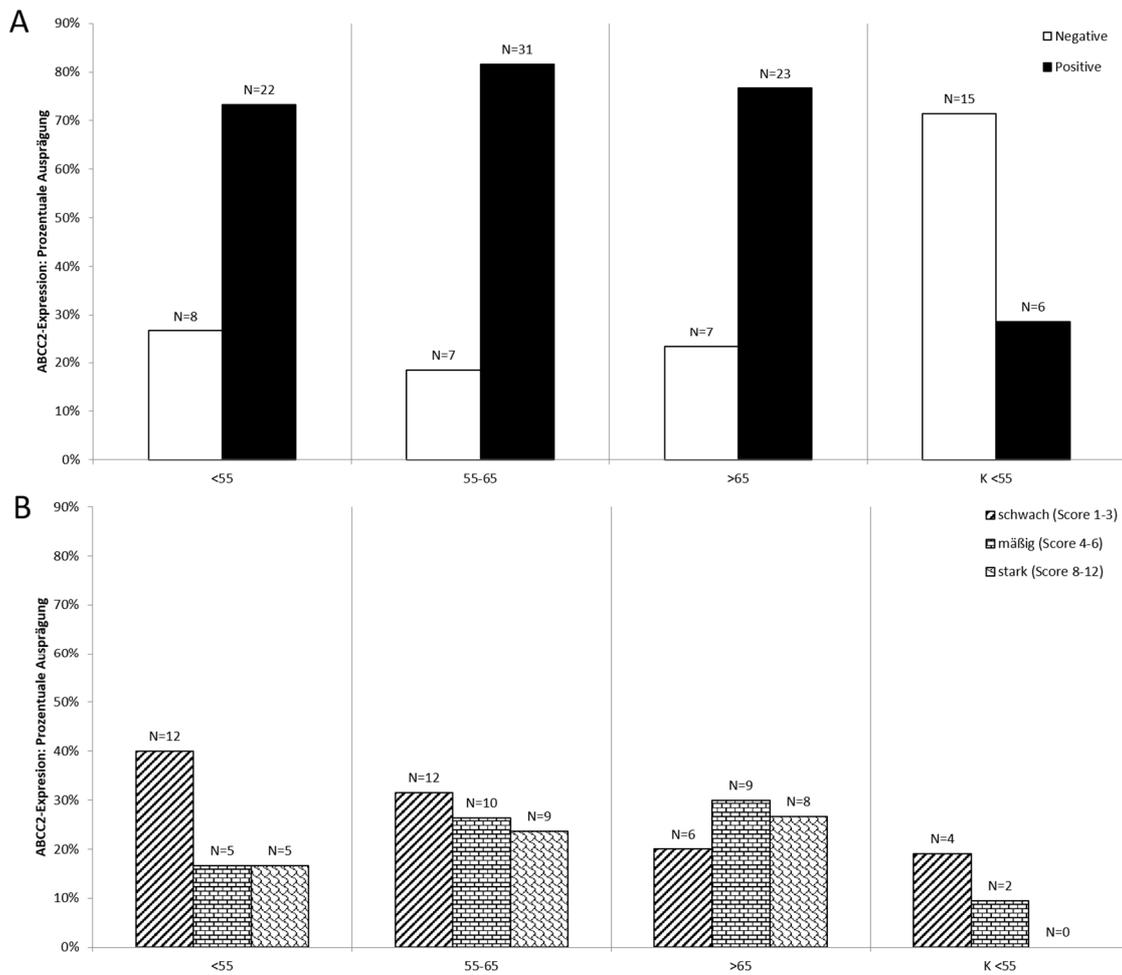


Abbildung 37. ABCC2 Expression – Korrelation mit Alter bei ED

A: Verhältnis von ABCC2 positiven und negativen Proben in HNSCC (<55, 55-65, >65) und Kontrollen (K <55) in den verschiedenen Altersgruppen. **B:** Differenzierung der ABCC2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. <55). Die ABCC2-Expression unterschied sich in den verschiedenen Altersgruppen nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$, Chi-Quadratstest; A: 0,714; B: 0,427 (ohne negative Ergebnisse)). Da alle Kontrollen bei Gewebeentnahme jünger als 55 Jahre waren, entspricht die Verteilung der Kontrollen in dieser Altersgruppe der Darstellung aller Kontrollen in Abb. 13, Kapitel 4.2.1.1.

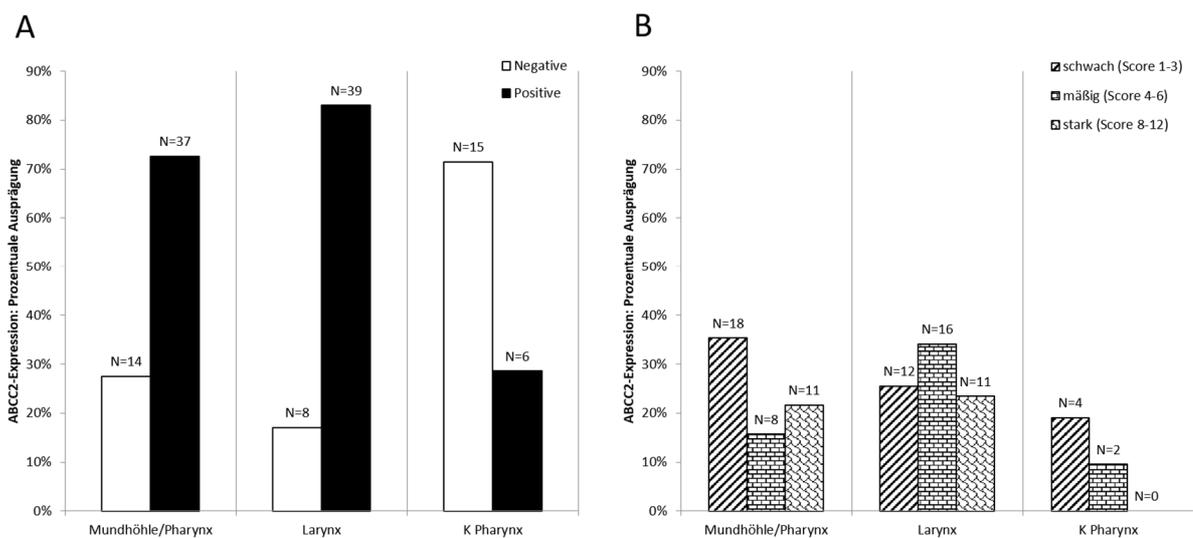


Abbildung 38. ABCC2 Expression – Korrelation mit Tumorkalisation

A: Verhältnis von ABCC2 positiven und negativen Proben in HNSCC (Mundhöhle/Pharynx, Larynx) und Kontrollen (K Pharynx) in den verschiedenen Lokalisationen. **B:** Differenzierung der ABCC2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. Larynx). Da alle Kontrollen aus dem Pharynx stammen, entspricht die Verteilung der Darstellung aller Kontrollen in Abb.13, Kapitel 4.2.1.1). Die ABCC2-Expression unterschied sich in den verschiedenen Lokalisationen nicht statistisch signifikant (Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest; A: $p = 0,216$; B: $p = 0,148$ (ohne negative Ergebnisse)).

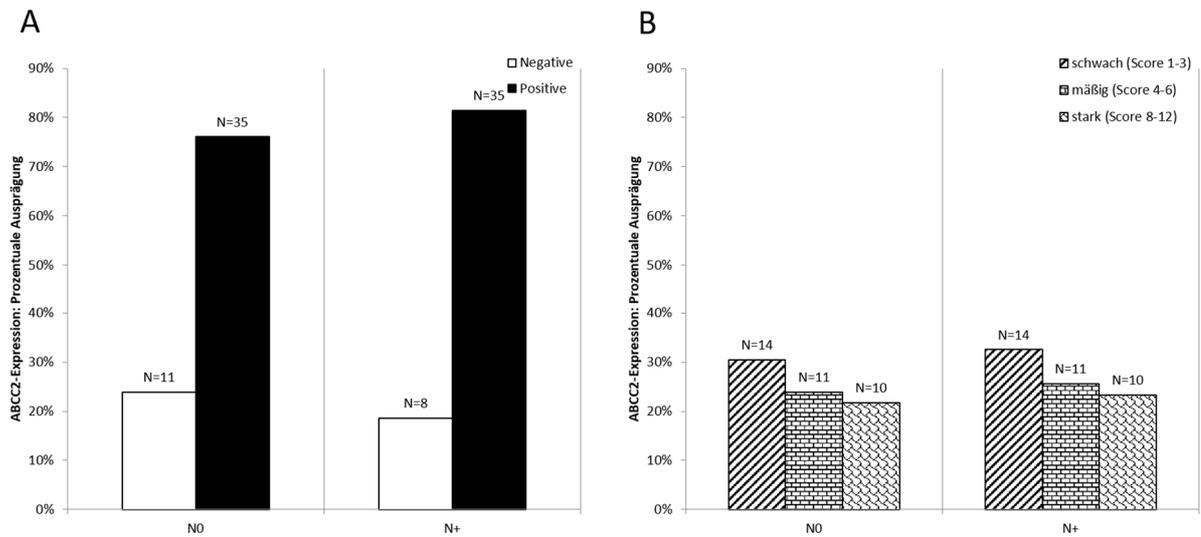


Abbildung 39. ABCC2 Expression – Korrelation mit N-Stadium

A: Verhältnis von ABCC2 positiven und negativen Proben in HNSCC_N0 vs. HNSCC_N+. **B:** Differenzierung der ABCC2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. N+). Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest; A: $p=0,541$; B: $p=1,0$ (ohne negative Ergebnisse)).

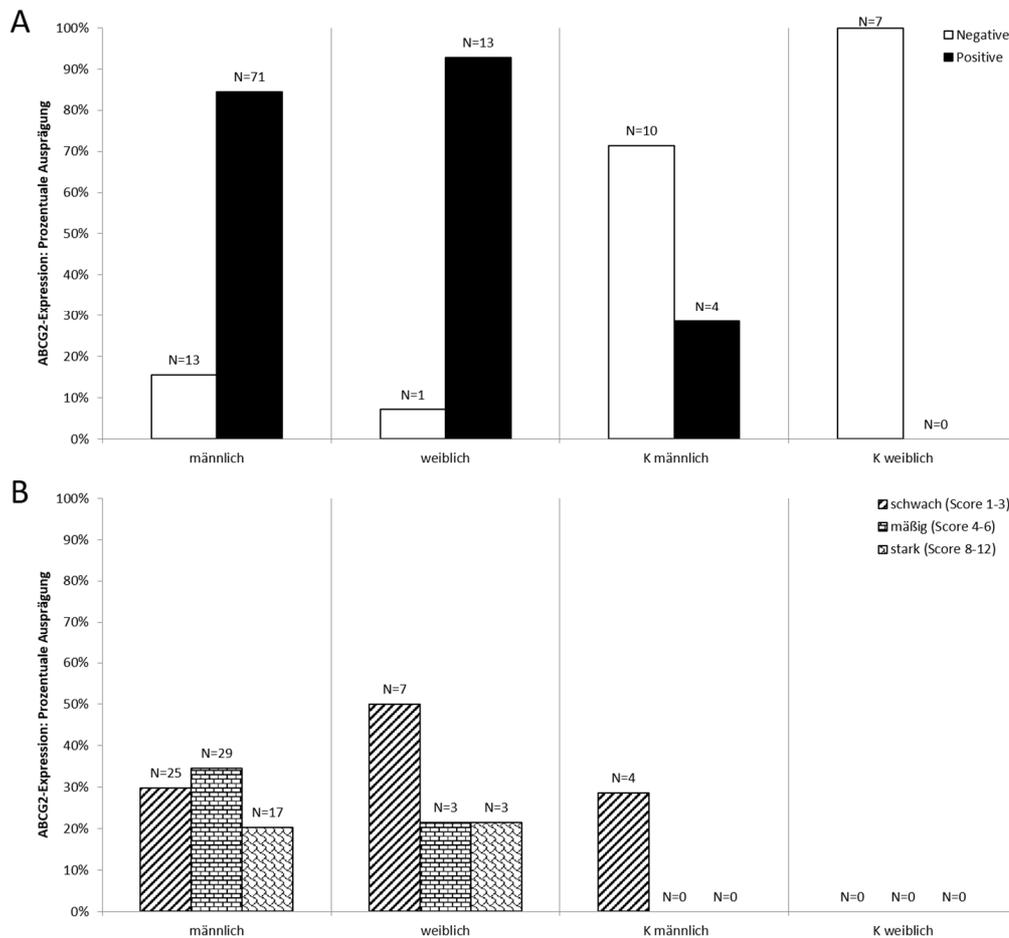


Abbildung 40. ABCG2 Expression – Korrelation mit Geschlecht

A: Verhältnis von ABCG2 positiven und negativen Proben in HNSCC (männlich, weiblich) und Kontrollen (K männlich, K weiblich). **B:** Differenzierung der ABCG2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. weiblich). Während sich auch in den Geschlechtersubgruppen im Vergleich von HNSCC und Kontrollen signifikante Unterschiede in der ABCG2-Expression ergaben ($p<0,001$; Exakter Test nach Fisher), konnten keine statistisch-signifikanten Unterschiede in der ABCG2-Expression in HNSCC zwischen den Geschlechtern festgestellt werden (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher; A: $p=0,685$; B: $p=0,409$ (ohne negative Ergebnisse)), siehe auch Tab. 16, tabellarischer Anhang.

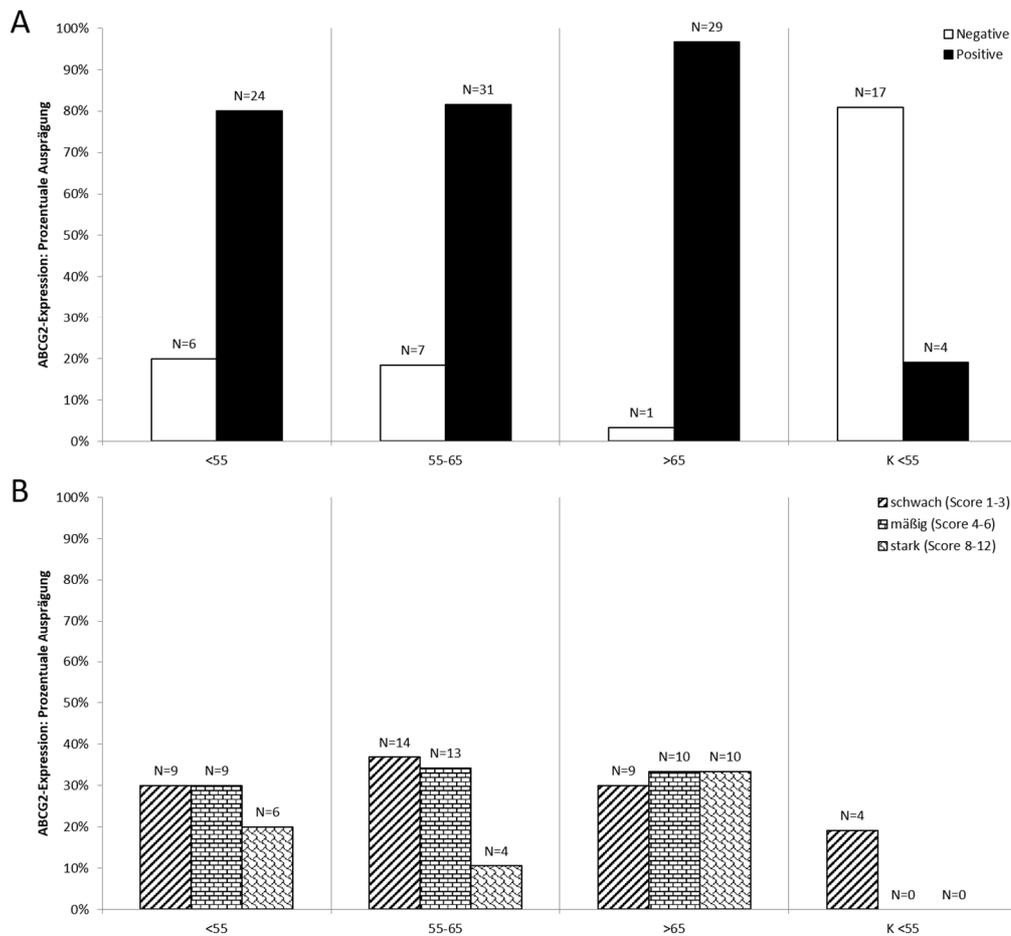


Abbildung 41. ABCG2 Expression – Korrelation mit Alter bei Erstdiagnose

A: Verhältnis von ABCG2 positiven und negativen Proben in HNSCC (<55, 55-65, >65) und Kontrollen (K <55) in den verschiedenen Altersgruppen. **B:** Differenzierung der ABCG2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. <55).

Die einzelnen Altersgruppen unterschieden sich in ihrer ABCG2-Expression zwar signifikant von derer der Kontrollen ($p < 0,001$; Chi-Quadratstest), allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von ABCG2 zwischen den einzelnen Altersgruppen in HNSCC (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher; $p = 0,124$). Auch der Vergleich von Patienten ≤ 65 J. und > 65 J. ergab einen knapp nicht signifikanten Unterschied ($p = 0,058$; Exakter Test nach Fisher). Da 100% der Kontrollen der jüngsten Gruppe (<55 Jahre) zuzuordnen waren, entspricht die Verteilung der Kontrollen in dieser Altersgruppe der Darstellung aller Kontrollen in Abb. 20, Kapitel 4.2.2.1.

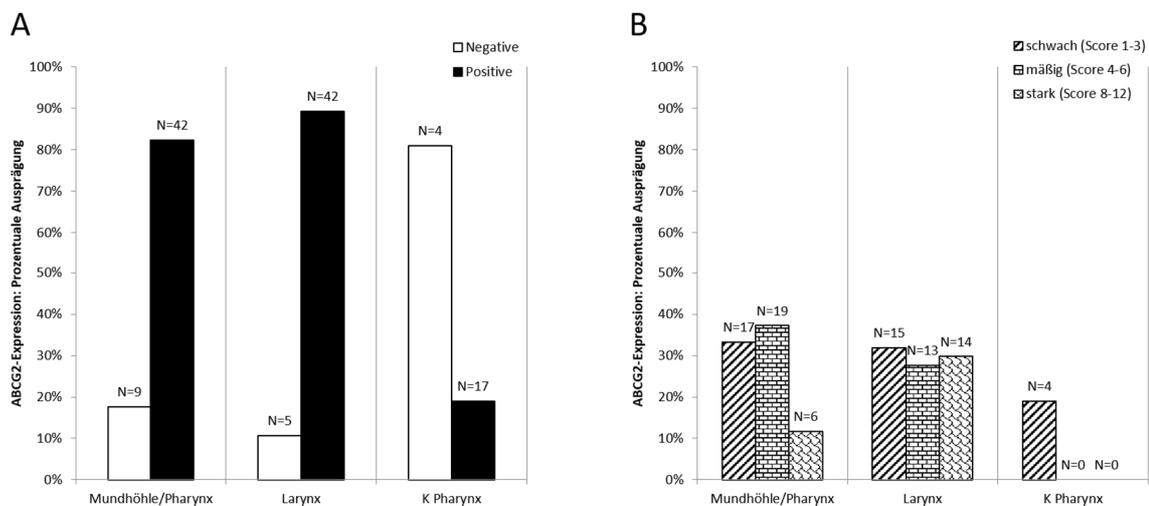


Abbildung 42. ABCG2 Expression – Korrelation mit Tumorlokalisation

A: Verhältnis von ABCG2 positiven und negativen Proben in HNSCC (Mundhöhle/Pharynx, Larynx) und Kontrollen (K Pharynx) in den verschiedenen Lokalisationen. **B:** Differenzierung der ABCG2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. Larynx).

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der ABCG2-Expression in HNSCC in Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors (Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest; A: $p = 0,322$; B: $p = 0,108$ (ohne negative Ergebnisse)). Da alle Kontrollen aus dem Pharynx stammen, entspricht die Verteilung der Darstellung aller Kontrollen in Abb. 20, Kapitel 4.2.2.1.

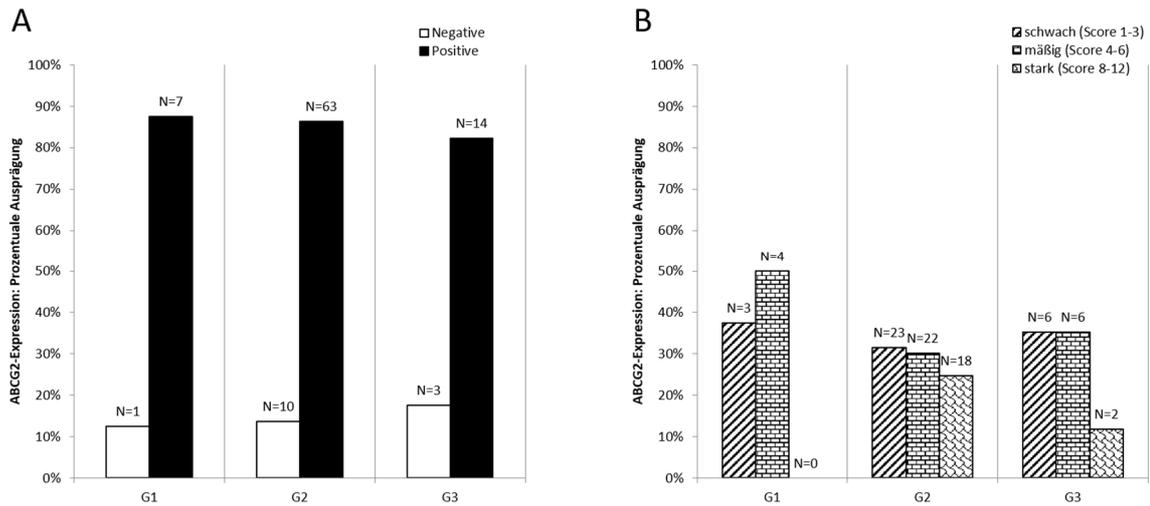


Abbildung 43. ABCG2 Expression – Korrelation mit Differenzierungsgrad G
A: Verhältnis von ABCG2 positiven und negativen Proben in HNSCC in Abhängigkeit vom *Grading*. **B:** Differenzierung der ABCG2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. G1). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der ABCG2-Expression in Abhängigkeit vom *Grading* in den von uns untersuchten HNSCC (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher; A: $p=0,881$; B: $p=0,451$ (ohne negative Ergebnisse)).

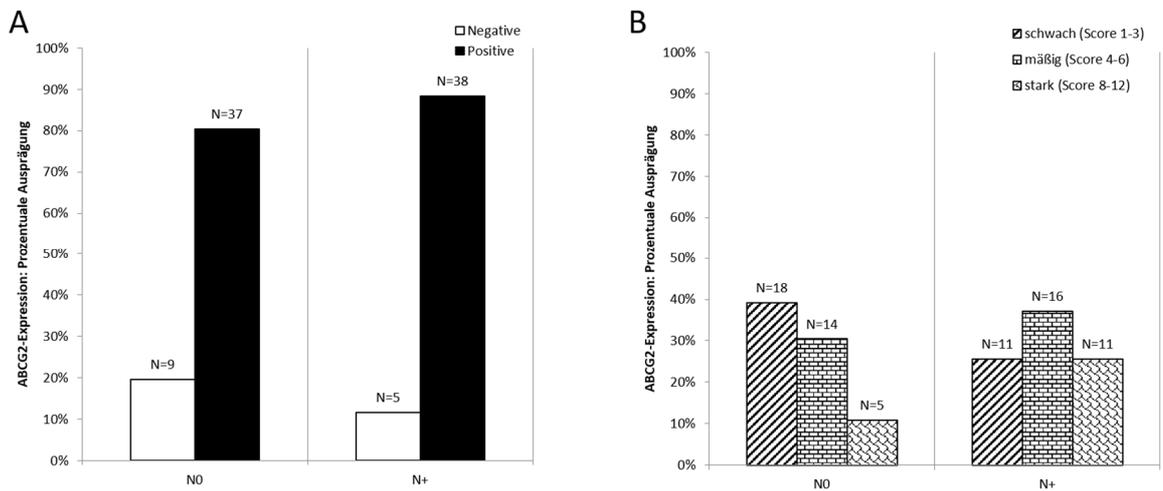


Abbildung 44. ABCG2 Expression – Korrelation mit N-Stadium
A: Verhältnis von ABCG2 positiven und negativen Proben in HNSCC_N0 vs. HNSCC_N+. **B:** Differenzierung der ABCG2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. N+). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der ABCG2-Expression zwischen HNSCC_N0 und HNSCC_N+ (Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest; A: $p=0,304$; B: $p=0,131$ (ohne negative Ergebnisse)).

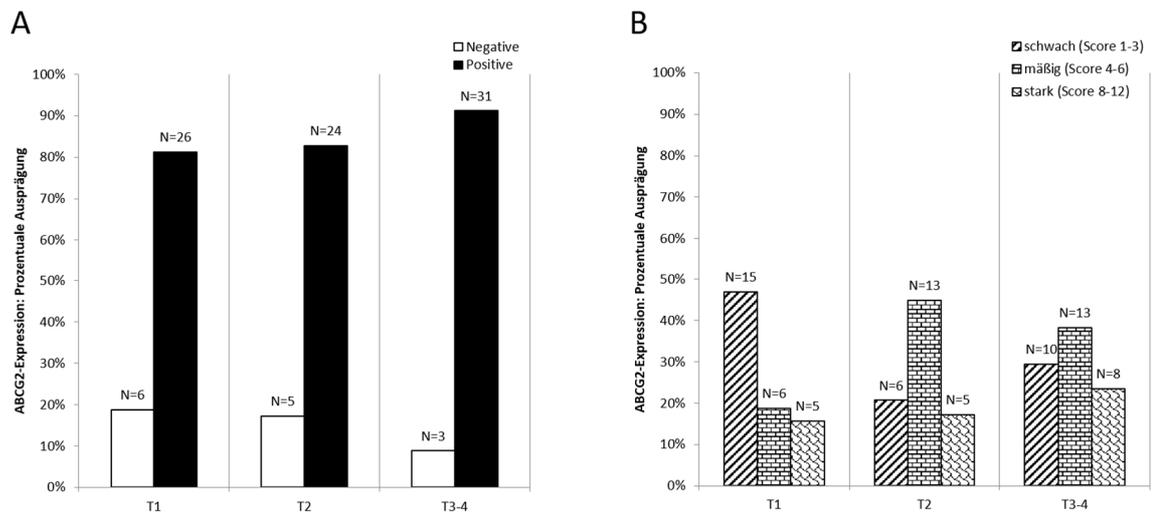


Abbildung 45. ABCG2 Expression – Korrelation mit T-Stadium

A: Verhältnis von ABCG2 positiven und negativen Proben in HNSCC. **B:** Differenzierung der ABCG2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. T1). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der ABCG2-Expression bezogen auf das T-Stadium (Kontingenztabellenanalyse; A: $p=0,480$ (Exakter Test nach Fisher), B: $0,117$ (Chi-Quadratstest)). Vergleicht man die Verteilung der positiven Ergebnisse nach Score in HNSCC_T1 und HNSCC_T>1 so ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,037$; Chi-Quadratstest). Dichotomisiert man nach Score <4 und Score >3 ergibt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den T-Stadien T1, T2 und T3-4 ($p=0,040$; Chi-Quadratstest).

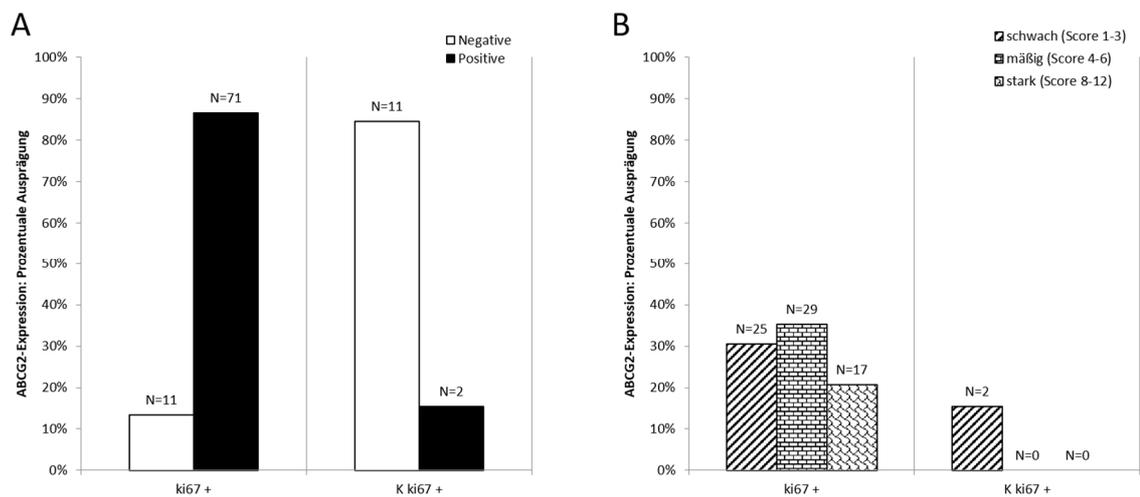


Abbildung 46. ABCG2 Expression in Ki-67+ HNSCC (Ki-67+) und Ki-67+ Kontrollen (K Ki-67+)

A: Verhältnis von ABCG2 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der ABCG2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Die ABCG2-Expression unterschied sich in Ki-67+ HNSCC und Ki-67+ Kontrollen signifikant ($p<0,001$; Exakter Test nach Fisher). Zwischen Ki-67 positiven HNSCC und Ki-67 negativen HNSCC ergab sich bezüglich der ABCG2-Expression kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,267$, Exakter Test nach Fisher), starker Unterschied in der Subgruppengröße (1 Ki-67 negatives HNSCC). Wertet man die Ki-67-Expression erst ab einem Score >3 als positiv, ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p=0,527$; Chi-Quadratstest).

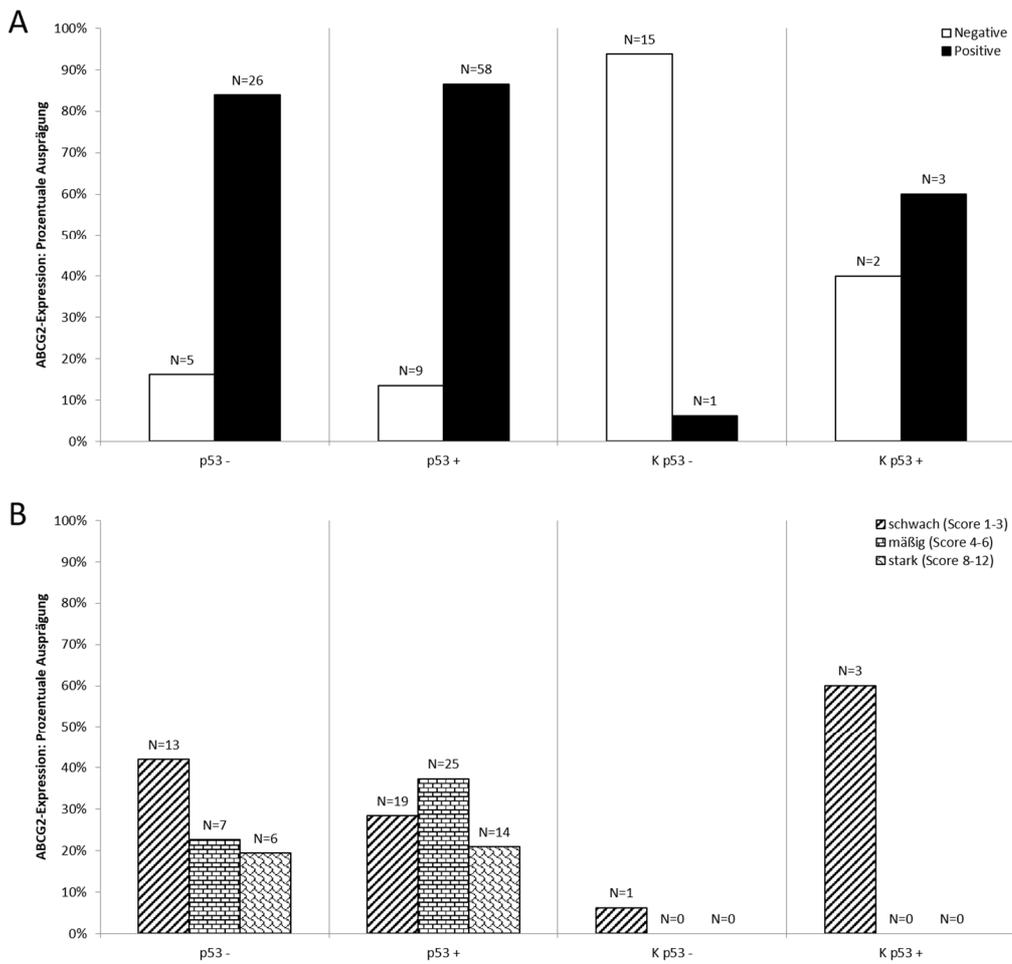


Abbildung 47. ABCG2 Expression in HNSCC und Kontrollen unter Berücksichtigung des p53-Status
A: Verhältnis von ABCG2 positiven und negativen Proben in p53 negativen und p53 positiven HNSCC (p53+/-) und Kontrollen (K p53+/-). **B:** Differenzierung der ABCG2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. p53+). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der ABCG2-Expression von HNSCC_p53+ und HNSCC_p53- gefunden werden ($p=0,723$; Chi-Quadratstest).

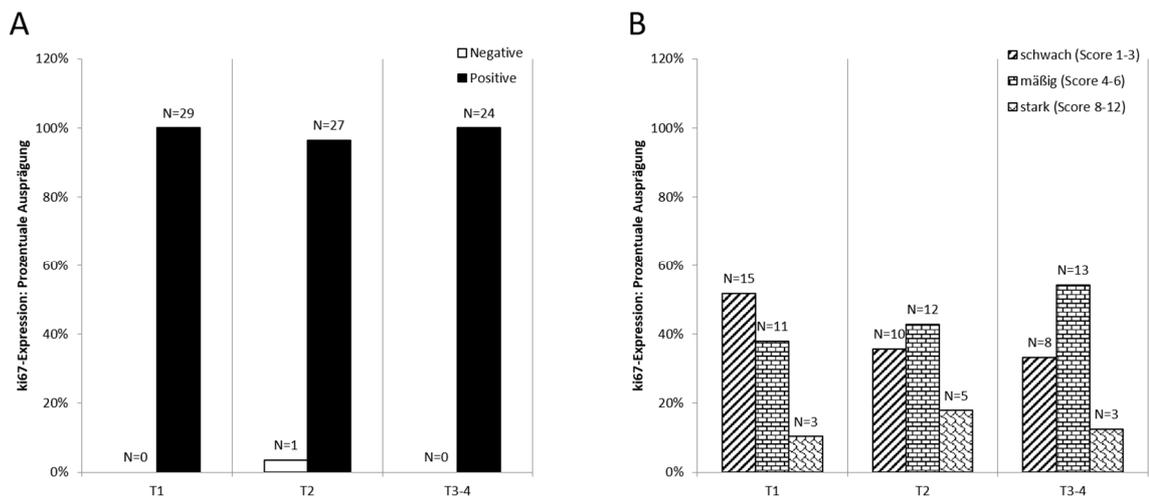


Abbildung 48. Ki-67 Expression – Korrelation mit T-Stadium
A: Verhältnis von Ki-67 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der Ki67 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. T1). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher; A: $p=0,642$; B: $p=0,619$).

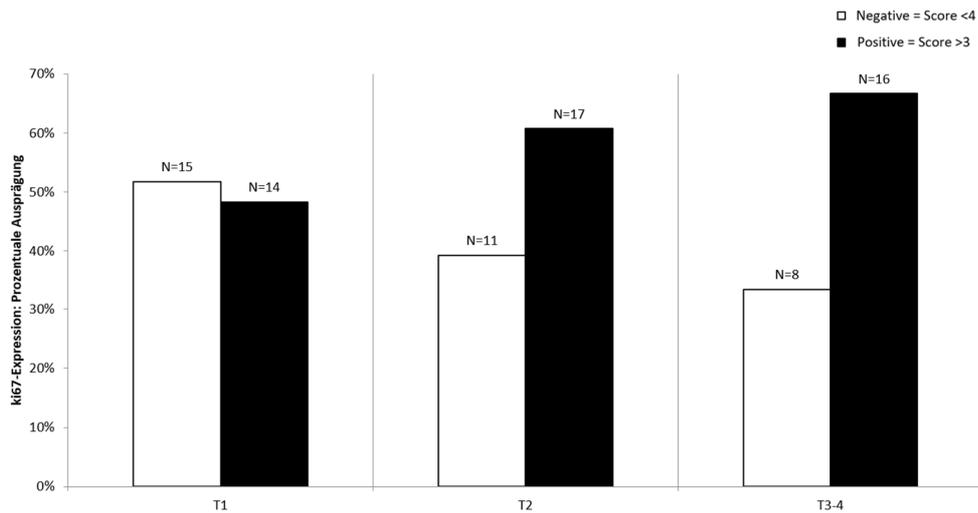


Abbildung 49. Ki-67 Score >3 vs. 0-3 – Korrelation mit T-Stadium

Relative Expression von Ki-67 in HNSCC in Abhängigkeit vom T-Stadium unter Berücksichtigung des Grenzwerts für ein positives Ergebnis von Ki-67 ab einem Score >3. Der beobachtete Effekt zeigte sich nicht als statistisch signifikant ($p=0,377$; Chi-Quadratstest).

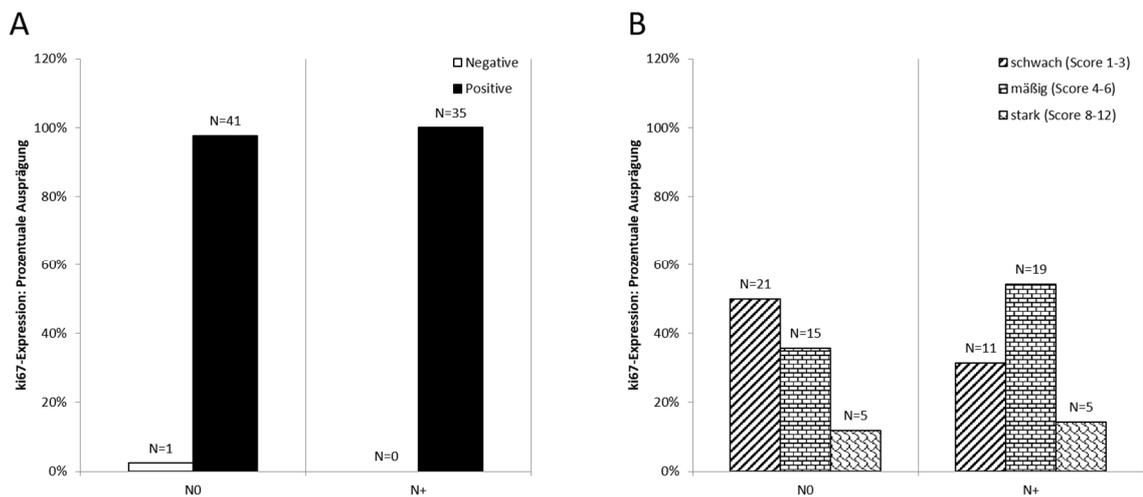


Abbildung 50. Ki-67 Expression – Korrelation mit N-Stadium

A: Verhältnis von Ki-67 positiven und negativen Proben in HNSCC in Abhängigkeit der Regionären Metastasierung. **B:** Differenzierung der Ki67 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. N+). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher; A: $p=1,0$, B: $p=0,210$).

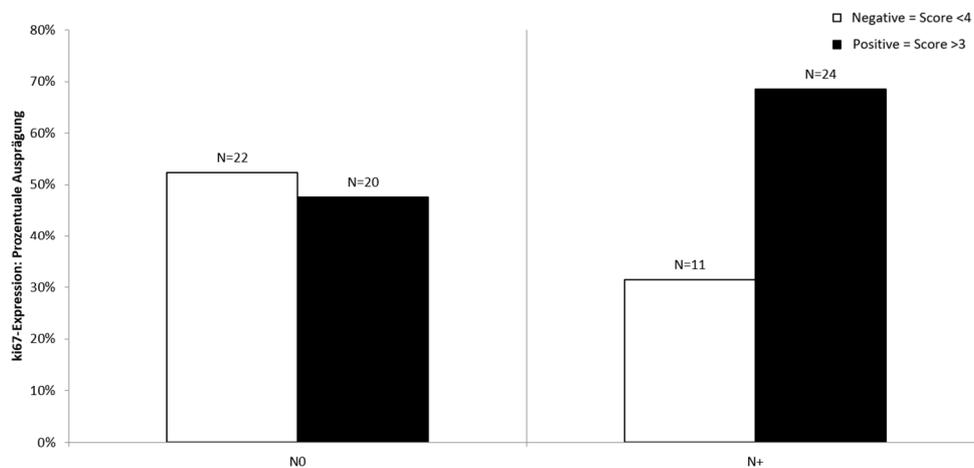


Abbildung 51. Ki-67 Score >3 vs. 0-3 – Korrelation mit N-Stadium

Relative Expression von Ki-67 in N0 und N+ HNSCC unter Berücksichtigung des Grenzwerts für ein positives Ergebnis von Ki-67 ab einem Score >3. Die Gruppen unterschieden sich knapp nicht signifikant ($p=0,064$; Chi-Quadratstest) bezüglich der Ki-67-Expression.

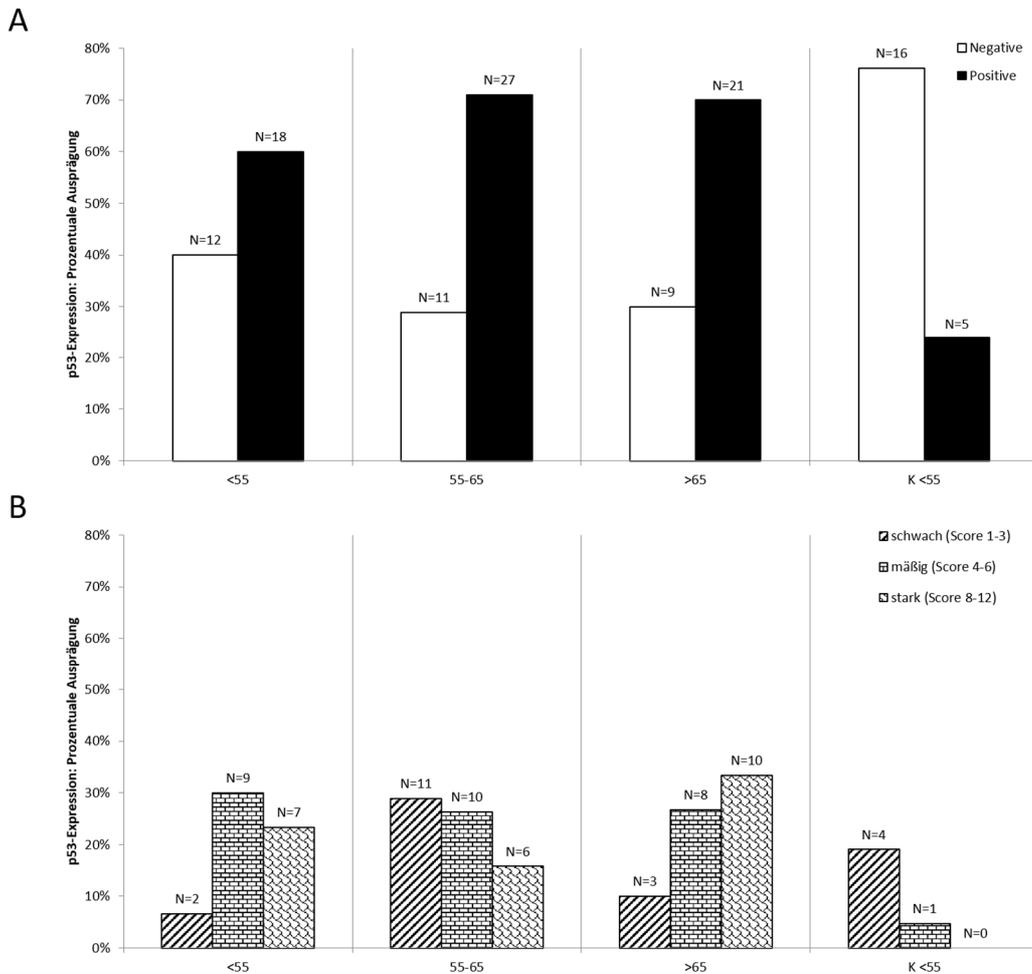


Abbildung 52. p53 Expression – Korrelation mit Erkrankungsalter

A: Verhältnis von p53 positiven und negativen Proben in HNSCC (<55, 55-65, >65) und Kontrollen (K <55) in den verschiedenen Altersgruppen. **B:** Differenzierung der p53 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. <55). Die Unterschiede in der p53-Expression gegenüber der Kontrollgruppe waren signifikant ($p < 0,05$; Chi-Quadratstest). Innerhalb der HNSCC unterschied sich die p53-Expression in den verschiedenen Altersgruppen nicht signifikant (Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest; A: $p = 0,586$; B: $p = 0,092$ (ohne negative Ergebnisse)).

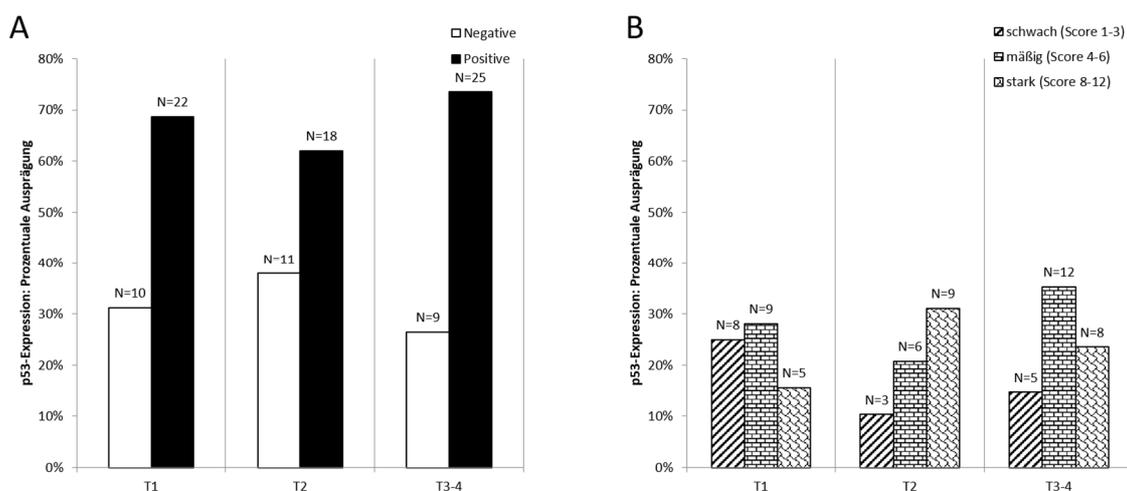


Abbildung 53. p53 Expression – Korrelation mit T-Stadium

A: Verhältnis von p53 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der p53 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. T1). Die Unterschiede in der p53-Expression gegenüber der Kontrollgruppe waren signifikant ($p < 0,05$; Chi-Quadratstest), die Unterschiede in der p53-Expression innerhalb HNSCC in Abhängigkeit vom T-Stadium waren nicht signifikant (Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest; A: $p = 0,621$; B: $p = 0,322$ (ohne negative Ergebnisse)).

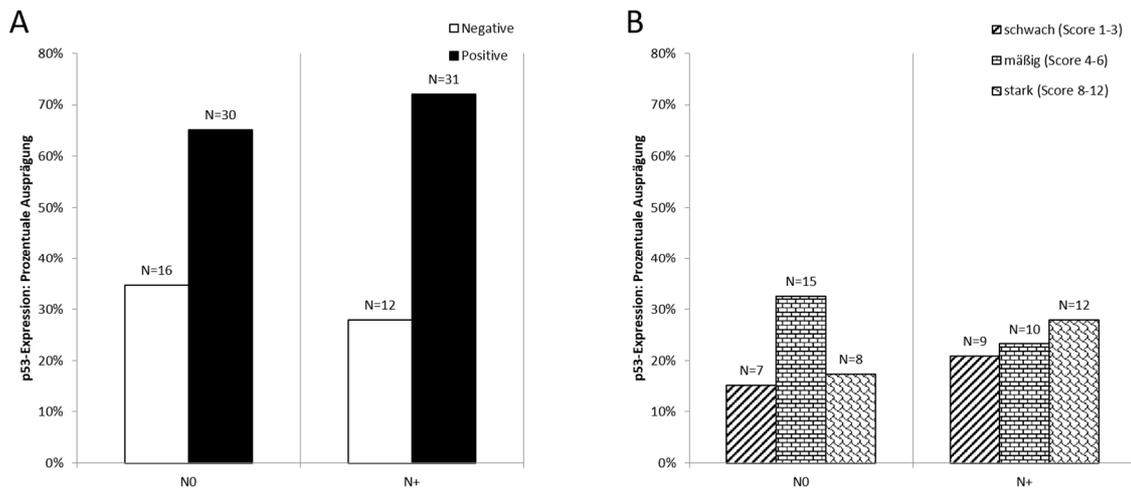


Abbildung 54. p53 Expression – Korrelation mit N-Stadium

A: Verhältnis von p53 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der p53 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. N+). Die Unterschiede in der p53-Expression gegenüber der Kontrollgruppe waren signifikant ($p < 0,05$; Chi-Quadratstest), die Unterschiede in der p53-Expression innerhalb HNSCC in Abhängigkeit vom N-Stadium waren nicht signifikant (Kontingenztabellenanalyse, Chi-Quadratstest; A: $p = 0,485$; B: $p = 0,361$ (ohne negative Ergebnisse)).

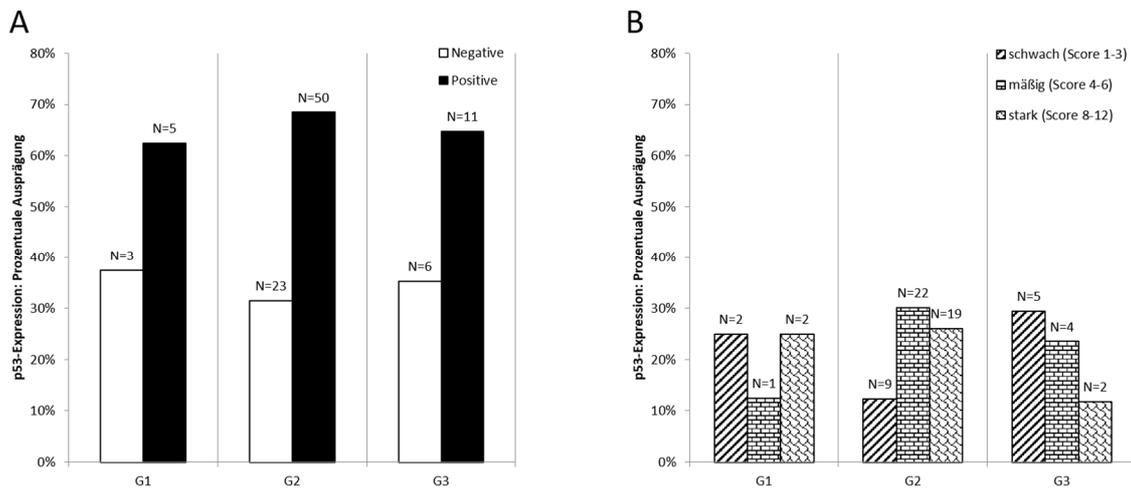


Abbildung 55. p53 Expression – Korrelation mit Differenzierungsgrad G

A: Verhältnis von p53 positiven und negativen Proben. **B:** Differenzierung der p53 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. G1). Die Unterschiede in der p53-Expression gegenüber der Kontrollgruppe waren, außer im Direktvergleich von G1 und Kontrollen, signifikant ($p < 0,05$; Chi-Quadratstest (Direktvergleich G2 bzw. G3 mit Kontrollen), Exakter Test nach Fisher (Gesamtvergleich; G1 vs. Kontrollen), die Unterschiede in der p53-Expression innerhalb HNSCC in Abhängigkeit vom Grading waren nicht signifikant (A: $p = 0,913$ (Chi-Quadratstest); B: $p = 0,254$ (Exakter Test nach Fisher, ohne negative Ergebnisse)).

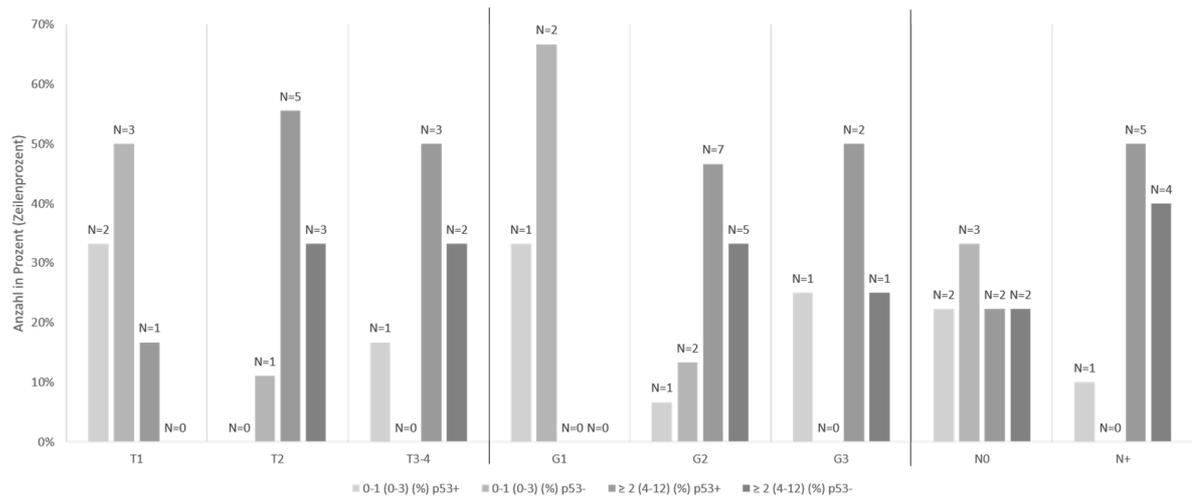


Abbildung 56. Ki-67/CK19/ABCG2/ABCC2 Score 0-3 vs. ≥ 4 , p53 +/-
 Ergebnisse einer Subgruppenanalyse mit Vergleich von HNSCC mit Co-Expression von Ki-67, CK19, ABCG2 und ABCC2 Score 0-3 („negativ“) im Vergleich mit HNSCC mit einem Score ≥ 4 („Überexpression“) für dieselben Marker, zusätzlich wurden diese Gruppen entsprechend ihres p53-Status nach p53+ und p53- dichotomisiert. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von T-, G- oder N-Stadium beobachtet werden (Kontingenztabellenanalyse, Exakter Test nach Fisher; T: $p=0,096$; G: $p=0,149$; N: $p=0,198$).

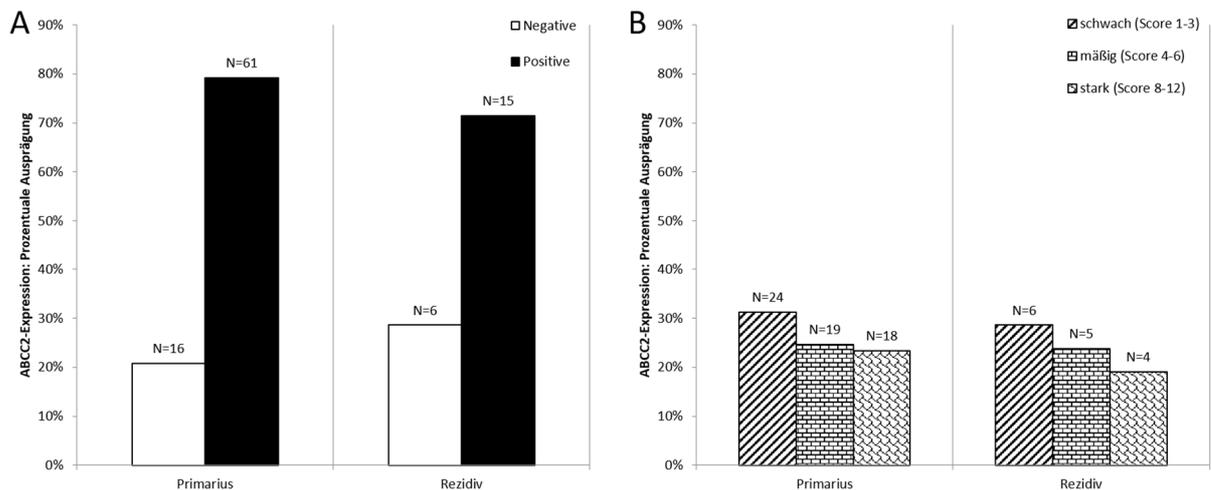


Abbildung 57. ABCC2 Expression – Primarius vs. Rezidiv
A: Verhältnis von ABCC2 positiven und negativen Proben in Primarien und Rezidiven. **B:** Differenzierung der ABCC2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. Rezidiv). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der ABCC2-Expression (A: $p=0,448$ (Chi-Quadratstest); B: $p=1,0$ (Exakter Test nach Fisher, ohne negative Ergebnisse)).

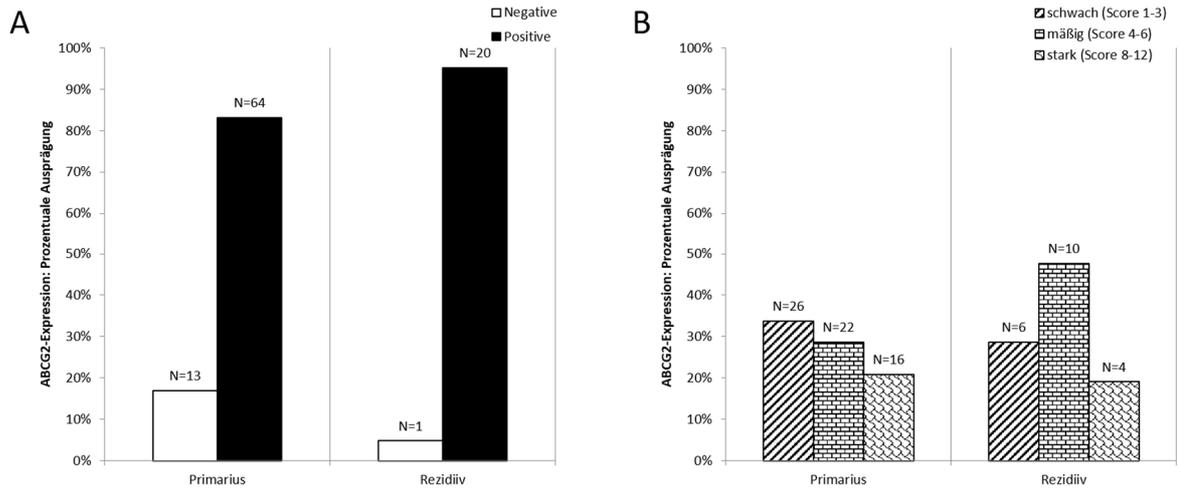


Abbildung 58. ABCG2 Expression – Primarius vs. Rezidiv

A: Verhältnis von ABCG2 positiven und negativen Proben in Primarien und Rezidiven. **B:** Differenzierung der ABCG2 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. Rezidiv). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von ABCG2 in Primarien und Rezidiven detektiert werden (A: $p=0,290$ (Exakter Test nach Fisher); B: $p=0,452$ (Chi-Quadratstest, ohne negative Ergebnisse)).

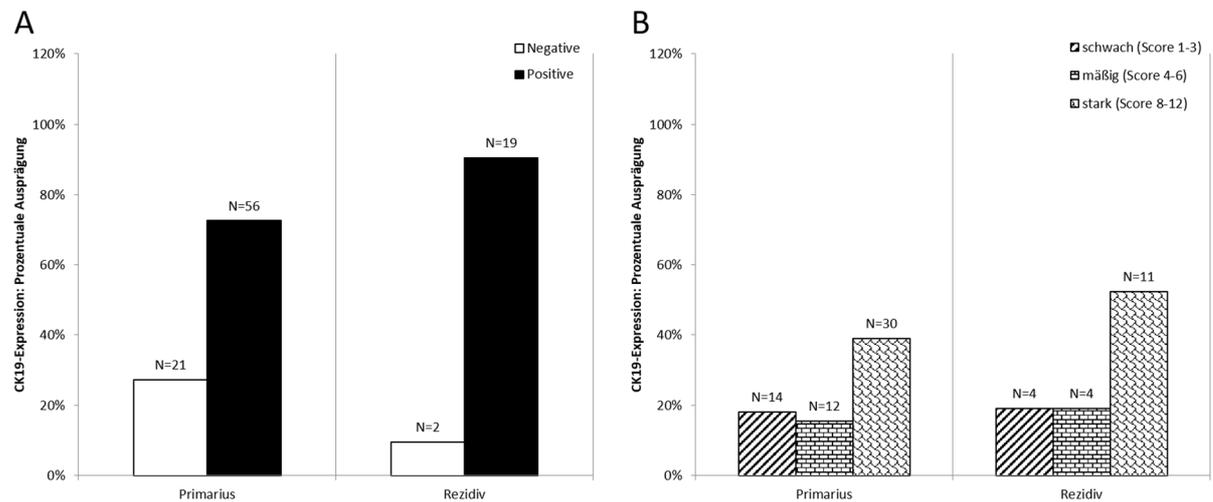


Abbildung 59. CK19 Expression – Primarius vs. Rezidiv

A: Verhältnis von CK19 positiven und negativen Proben bei Primarien und Rezidiven. **B:** Differenzierung der CK19 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. Rezidiv). Statistisch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Primarien und Rezidiven in Bezug auf die CK19-Expression (A: $p=0,144$; Exakter Test nach Fisher). Der Vergleich der verschiedenen Ausprägungen des positiven Farbergebnisses (Scoring) ergibt ein nahezu identisches Bild in beiden Gruppen (B: $p=1,0$; Exakter Test nach Fisher).

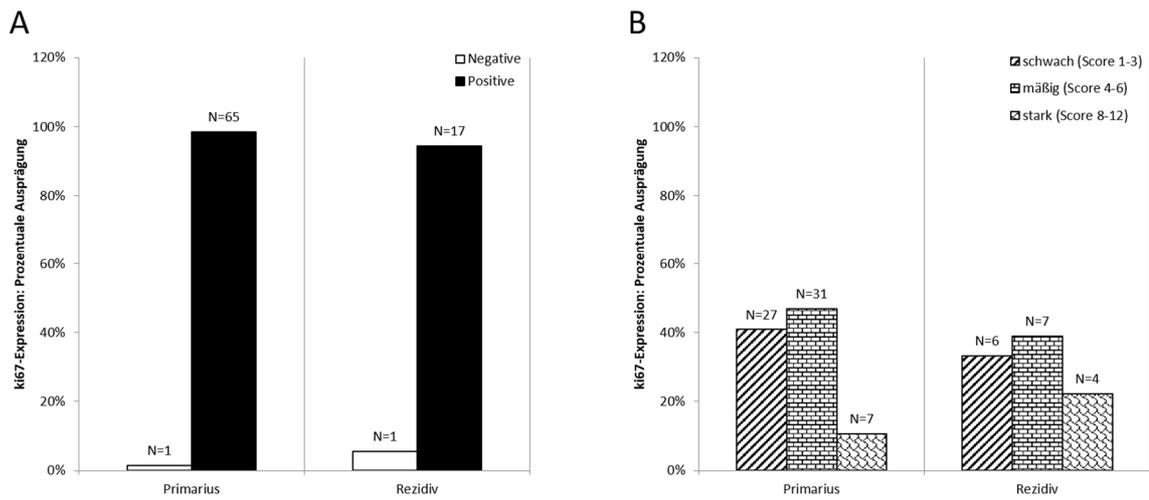


Abbildung 60. Ki-67 Expression – Primarius vs. Rezidiv

A: Verhältnis von Ki-67 positiven und negativen Proben in Primarien und Rezidiven. **B:** Differenzierung der Ki-67 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Der Prozentsatz bezieht sich auf die jeweilige Grundgesamtheit, wie auf der x-Achse angegeben (z.B. Rezidiv). Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Primarien und Rezidiven hinsichtlich der Ki-67-Expression (A: $p=0,385$ (Exakter Test nach Fisher); B: $p=0,389$ (Chi-Quadrattest, ohne negative Ergebnisse)).

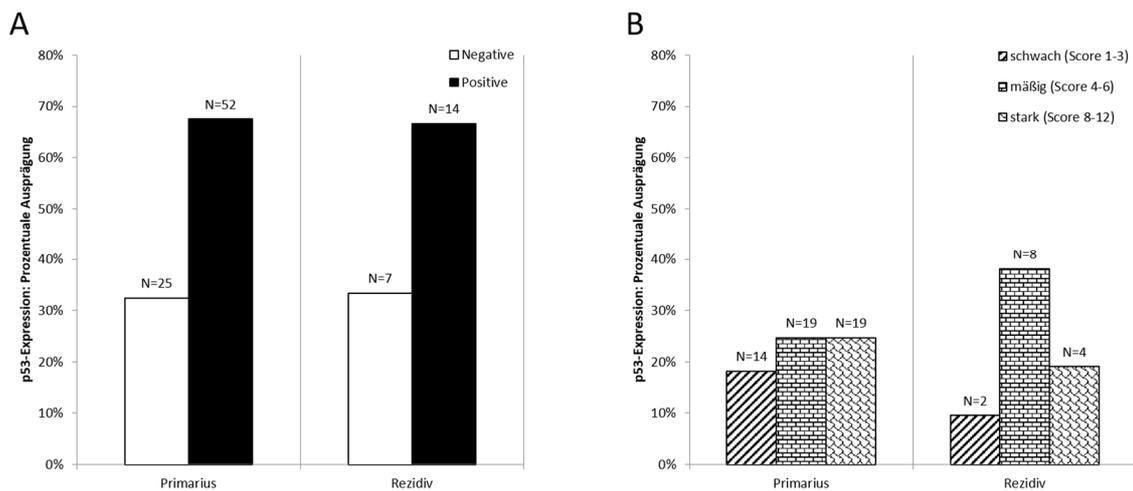


Abbildung 61. p53 Expression – Primarius vs. Rezidiv

A: Verhältnis von p53 positiven und negativen Proben in Primarien und Rezidiven. **B:** Differenzierung der p53 positiven Proben in die 3 Subgruppen schwach, mäßig und stark. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der p53-Expression zwischen Primarien und Rezidiven gefunden werden (A: $p=0,940$ (Chi-Quadrattest); B: $p=0,380$ (Exakter Test nach Fisher, ohne negative Ergebnisse)).

10 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER*INNEN

Meine akademischen Lehrenden in Marburg waren:

Prof. Dr. Aumüller	Prof. Dr. Lohoff
Dr. Adamkiewicz	Prof. Dr. Maier
Prof. Dr. Barth	Prof. Dr. Maisch
Prof. Dr. Bartsch	Prof. Dr. Mandic
Prof. Dr. Dr. Basler	Dr. Dr. Mandrek
Prof. Dr. Bauer	Prof. Dr. Moll
Prof. Dr. Baum	Prof. Dr. Moosdorf
Prof. Dr. K. Becker	Prof. Dr. Dr. Mueller
Prof. Dr. S. Becker	Dr. med. Dipl. Psych. Müller
Prof. Dr. Berger	Prof. Dr. Neubauer
PD Dr. Best	Prof. Dr. Neumüller
Prof. Dr. Bette	Dr. Kolb-Niemann
Prof. Dr. Bien	Prof. Dr. Nimsky
Prof. Dr. Brehm	Prof. Dr. Ocker
Prof. Dr. Cetin	Prof. Dr. Oertel
Prof. Dr. Czubayko	Dr. Opitz
Prof. Dr. Dr. Daut	Prof. Dr. Pagenstecher
Prof. Dr. Donner-Banzhoff	Prof. Dr. Plant
Prof. Dr. M. Eilers	Prof. Dr. Renz
Prof. Dr. Engenhardt- Cabillic	Prof. Dr. Richter
Dr. Feuser	Prof. Dr. Riße
Prof. Dr. Fuchs-Winkelmann	Prof. Dr. Röhm
PD Dr. Frangen	Prof. Dr. Ruchholtz
Prof. Dr. Görg	Prof. Dr. H. Schäfer
Dr. med. Graz	Prof. Dr. M. K.-H. Schäfer
Prof. Dr. Gress	Prof. Dr. Schmidt
Prof. Dr. Grzeschik	Prof. Dr. Schofer
Dr. Grundmann	PD Dr. Schrader
PD Dr. Hassan	Prof. Dr. Sekundo
Prof. Dr. Hertl	Prof. Dr. Sesterhenn
PD Dr. Höffken	Prof. Dr. Steiniger
Prof. Dr. Hofmann	Prof. Dr. Teymoortash
Prof. Dr. Hoyer	Prof. Dr. Vogelmeier
Prof. Dr. Dr. Kann	Prof. Dr. med. Wagner
Prof. Dr. Kircher	Prof. Dr. Weihe
Prof. Dr. Klaus J. Klose	Prof. Dr. Werner
Prof. Dr. Jan Koolman	PD Dr. Westermann
Prof. Dr. Kühne	Prof. Dr. Wulf
Prof. Dr. Lill	PD Dr. Zettl

Meine akademischen Lehrenden in Kassel waren:

Prof. Dr. Faß	Prof. Dr. Raible
Prof. Dr. Plum	Prof. Dr. Tegtmeyer

11 DANKSAGUNG

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Mandic für die Überlassung des Themas und die ausdauernde Betreuung meiner Arbeit. Angefangen bei der Planung, über die praktische Durchführung im Labor, bis hin zur Durchsicht des Manuskripts und die vielen wertvollen Hinweise, die zur Vollendung desselben notwendig waren, war seine stets präsente Unterstützung von außerordentlichem Wert.

Herrn Prof. Dr. M. Bette vom Institut für Anatomie und Zellbiologie Marburg danke ich für die Einweisung und Nutzung des Zeiss Axio Imager 2 Mikroskops. Besonders wertvoll waren darüber hinaus sein immer freundlicher Rat sowie seine äußerst hilfreichen Rückmeldungen im Rahmen der Fertigstellung der vorliegenden Monographie, die bedeutend zu ihrer Fertigstellung beitrugen.

Frau R. Peldszus und Frau G. Sadowski, den beiden „guten Seelen“ des Labors danke ich für ihre immer freundliche und ausdauernde Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, dem Auffinden von benötigten Materialien sowie für ihre stets erheiternden und aufmunternden Worte.

Frau Dr. C. Brehm und Frau Prof. Dr. Dr. P. Pfefferle von der Biomaterialbank CBBMR sowie Herrn Baldeweg vom Institut für Pathologie danke ich für die bedeutende Unterstützung bei der Recherche und Beschaffung der verwendeten Patientenproben und klinischen Daten sowie für den guten kollegialen Austausch.

Frau Dr. F. Rodepeter danke ich für die allzeit freundliche und fachmännische Beratung und unverzichtbare Unterstützung bei der Auswertung der immunhistologischen Präparate.

Weiter danke ich meinen Mit-Doktoranden und Diplomanden für eine stets kollegiale und fröhliche Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für den immerwährenden Rückhalt.