

Technische Universität München

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Die prognostische Bedeutung des NOTCH-Signalweges auf den Krankheitsverlauf von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs

Daniel Philipp Jira

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzende/-r:

Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Anja C. Pickhard

2. Priv.-Doz. Dr. Markus Wirth

Die Dissertation wurde am 03.07.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.10.2019 angenommen.

Meinen Eltern, für ihr unaufhörliche und liebevolle Unterstützung

1 Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 2 | Einleitung | 5 |
| 2.1 | Das Plattenepithelkarzinom des Hals-Kopf-Bereichs | 5 |
| 2.1.1 | Epidemiologie | 5 |
| 2.1.2 | Ätiologie | 5 |
| 2.1.3 | Klassifikation | 6 |
| 2.1.4 | Pathologie | 9 |
| 2.1.5 | Diagnostik | 10 |
| 2.1.6 | Therapie | 10 |
| 2.1.7 | Prognose | 11 |
| 2.2 | Molekulare Grundlagen | 12 |
| 2.2.1 | Molekularpathologie | 12 |
| 2.2.2 | Humanes Papillomavirus | 13 |
| 2.2.3 | Der NOTCH-Signalweg | 13 |
| 2.2.4 | Zielsetzung der Arbeit | 15 |
| 3 | Material und Methoden | 16 |
| 3.1 | Material | 16 |
| 3.1.1 | Patientenkollektiv | 16 |
| 3.1.2 | Kits | 16 |
| 3.1.3 | Reagenzien | 16 |
| 3.1.4 | Reagenzien und Puffer | 17 |
| 3.1.5 | Verbrauchsmaterialien | 17 |
| 3.1.6 | Verwendete Geräte | 18 |
| 3.1.7 | Computersoftware | 20 |
| 3.2 | Methoden | 20 |
| 3.2.1 | Auswahl der Gewebeproben | 20 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.2.2 | RNA-Isolierung aus FFPE-Material..... | 21 |
| 3.2.3 | Synthese cDNA | 22 |
| 3.2.4 | PCR | 22 |
| 3.2.5 | Etablierung der Primer | 23 |
| 3.2.6 | Agarose-Gelelektrophorese | 24 |
| 3.2.7 | Quantitative real-time PCR | 25 |
| 3.2.8 | Immunhistochemie..... | 26 |
| 3.2.9 | Statistische Analyse..... | 27 |
| 4 | Ergebnisse | 28 |
| 4.1 | Patientenkollektiv | 28 |
| 4.2 | p16 ^{INK4} -Status..... | 30 |
| 4.3 | Expression des NOTCH-Signalweges in Tumor- und Normalgewebe | 31 |
| 4.4 | Überlebenszeitanalyse | 32 |
| 4.4.1 | Kollektiv | 33 |
| 4.4.2 | p16-Status und Überleben..... | 34 |
| 4.4.3 | NOTCH-Signalweg und Überleben..... | 35 |
| 4.4.4 | Gesamtüberleben | 35 |
| 4.4.5 | Krankheitsfreies Überleben | 37 |
| 4.4.6 | NOTCH-Signalweg, p16-Status und Überleben | 41 |
| 5 | Diskussion..... | 46 |
| 5.1 | Erniedrigte Expression des NOTCH-Signalweges bei HNSCC..... | 46 |
| 5.2 | Hohe Expression des NOTCH-Signalweges geht mit besserem Überleben einher | 47 |
| 5.3 | p16-positive Karzinome mit hoher NOTCH-Expression zeigen eine gute Prognose | 48 |
| 5.4 | Ausblick..... | 51 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 53 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis | 54 |

| | | |
|----|-----------------------------|----|
| 8 | Abbildungsverzeichnis..... | 56 |
| 9 | Tabellenverzeichnis | 57 |
| 10 | Literatur..... | 58 |
| 11 | Vorveröffentlichungen | 61 |
| 12 | Danksagung..... | 63 |

2 Einleitung

2.1 Das Plattenepithelkarzinom des Hals-Kopf-Bereichs

2.1.1 Epidemiologie

Karzinome des Hals-Kopf-Bereichs stellen die sechst-häufigste Krebserkrankung weltweit dar, gleichzeitig handelt es sich um die siebt-häufigste tumorbezogene Todesursache (Hunter, Parkinson, & Harrison, 2005; Jemal, Siegel, Xu, & Ward, 2010). Es handelt sich hierbei in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle um Plattenepithelkarzinome (HNSCC, head and neck squamous-cell carcinoma), welche in dieser Arbeit untersucht werden. In Deutschland erkrankten im Jahr 2014 16.330 Menschen an Malignomen im Bereich des Mundes, Rachens oder Kehlkopfes (3,43% aller Krebserkrankungen), 6973 Patienten verstarben (3,13% aller Krebstodesfälle). Aufgrund der aus soziokulturellen Gründen unterschiedlichen Exposition zu den Risikofaktoren waren hierbei deutlich mehr Männer als Frauen betroffen (Kaatsch et al., 2017).

Das mittlere Erkrankungsalter für oropharyngeale Karzinome liegt in Deutschland bei 63 (Männer) bzw. 66 (Frauen) Jahren und damit früher als bei Krebserkrankungen insgesamt (Kaatsch et al., 2017). Betrachtet man die lokale Verteilung von Kopf-Hals-Tumoren, so fällt auf, dass Malignome am häufigsten den Oropharynx betreffen, gefolgt von Karzinomen der Mundhöhle, des Larynx und des Hypopharynx (Mast, 2014).

2.1.2 Ätiologie

Die genauen Ursachen für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Hals-Kopf-Bereich sind noch nicht eindeutig geklärt, es wurden aber bereits einige Risikofaktoren unterschiedlicher Relevanz identifiziert.

In westlichen Ländern wie Deutschland stellen Tabak- und Alkoholabusus die hauptsächlichen Risikofaktoren dar. Speziell die Kombination aus beiden Faktoren erhöht das Risiko, an einem solchen Plattenepithelkarzinom zu erkranken, beträchtlich. Studien zeigen hier eine über 48-fache Erhöhung des Risikos (Rodriguez et al., 2004). Global betrachtet kommt neben diesen Risikofaktoren unter anderem auch dem Kauen von Betelnuss eine relevante

Bedeutung in der Tumorentstehung zu (Hernandez et al., 2017). Zusätzlich zeigte sich in den letzten Jahren speziell bei Patienten mit jüngerem Erkrankungsalter und ohne klassische Risikofaktoren ein Einfluss von Infektionen mit dem humanen Papillomavirus (HPV) auf die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren (Ragin, Modugno, & Gollin, 2007).

2.1.3 Klassifikation

Wie alle anderen Tumorentitäten wird auch das Plattenepithelkarzinom des Hals-Kopf-Bereichs von der internationalen Vereinigung gegen Krebs (Union internationale contre le cancer, UICC) nach dem TNM-System eingeteilt. Dieses System dient zur Einteilung von Malignomen anhand deren anatomischen Ausbreitung. „T“ beschreibt hierbei die Ausdehnung des Primarius, während „N“ und „M“ lokale Lymphknotenmetastasen bzw. Fernmetastasen und deren Ausbreitung beschreiben. Die Ausdehnung wird jeweils durch eine nachgestellte Ziffer und ggf. einen Buchstaben beschrieben. Auf selbe Weise werden das histopathologische Grading („G“) sowie der Resektionsstatus/Residualtumor („R“) beschrieben. Über ein Präfix wird unter anderem angegeben, ob die Einteilung aufgrund klinischer („c“) oder histopathologischer („p“) Untersuchungen erfolgte (C. I. U. a. C. Wittekind, 2003).

Da in der Arbeit Karzinome mit Diagnosestellung in den Jahren 2002-2005 untersucht wurden, wird im Folgenden die Klassifikation der sechsten Auflage vorgestellt. Nach dieser Auflage ist die Unterteilung des T-Stadiums der Plattenepithelkarzinome des Hals-Kopf-Bereichs abhängig von der Lokalisation des jeweiligen Tumors, während N-, M- und G-Stadium sowie der Resektionsstatus für alle Tumorlokalisationen identisch sind (ausgenommen dem Nasopharynxkarzinom, welches in der vorliegenden Arbeit nicht behandelt wird). Tab. 1-5 zeigen die entsprechende TNM-Klassifikation anhand histopathologischer Kriterien (C. I. U. a. C. Wittekind, 2003).

| | |
|-------------------------|--|
| pT - Primärtumor | |
| pTX | Primärtumor kann histologisch nicht beurteilt werden |
| pT0 | Kein histologischer Anhalt für Primärtumor |
| pTis | Carcinoma in situ |
| pT1 – pT4 | Zunehmende Größe und/oder lokale Ausdehnung des Primärtumors bei histologischer Untersuchung |

Tabelle 1: pathologische Klassifikation des Primärtumors (nach Wittekind, 2003)

| pN – Regionäre Lymphknoten | |
|-----------------------------------|--|
| pNX | Regionäre Lymphknoten können histologisch nicht beurteilt werden |
| pN0 | Histologisch keine Lymphknotenmetastasen |
| pN1 | Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, maximal 3cm in größter Ausdehnung |
| pN2 | Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten >3cm aber ≤ 6cm in größter Ausdehnung oder in multiplen ipsilateralen oder bi- oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6cm in größter Ausdehnung |
| pN2a | Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten >3cm aber ≤ 6cm in größter Ausdehnung |
| pN2b | Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6cm in größter Ausdehnung |
| pN2c | Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6cm in größter Ausdehnung |
| pN3 | Metastase(n) in Lymphknoten, >6cm in größter Ausdehnung |

Tabelle 2: pathologische Klassifikation der regionären Lymphknoten (nach Wittekind, 2003)

| pM - Fernmetastasen | |
|----------------------------|--|
| pMX | Fernmetastasen können mikroskopisch nicht beurteilt werden |
| pM0 | Mikroskopisch keine Fernmetastasen |
| pM1 | Mikroskopisch Fernmetastasen |

Tabelle 3: pathologische Klassifikation der Fernmetastasen (nach Wittekind, 2003)

| G – Histopathologisches Grading | |
|--|---|
| GX | Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden |
| G1 | Gut differenziert |
| G2 | Mäßig differenziert |
| G3 | Schlecht differenziert |
| G4 | undifferenziert |

Tabelle 4: Histopathologisches Grading (nach Wittekind, 2003)

| R – Residualtumor | |
|--------------------------|---|
| RX | Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden |
| R0 | Kein Residualtumor |
| R1 | Mikroskopischer Residualtumor |
| R2 | Makroskopischer Residualtumor |

Tabelle 5: Klassifikation des Residualtumors (nach Wittekind, 2003)

Die TNM-Klassifikation wurde zuletzt 2017 überarbeitet. Als wohl gravierendste Änderung in der achten Auflage werden nun p16^{INK4}-positive Oropharynxkarzinome als eigene Subgruppe betrachtet, sodass sich hier sowohl in der Betrachtung des Primärtumors als auch der lokoregionären Lymphknotenmetastasierung Unterschiede ergeben (Brierley, Gospodarowicz, & Wittekind, 2017).

2.1.4 Pathologie

Plattenepithelkarzinome des Hals-Kopf-Bereichs sind epitheliale Tumore mit meist endophytischem Wachstum und knotig-ulzerierender Oberfläche, gelegentlich findet sich aber auch makroskopisch ein exophytisches, papilläres Wachstum. Weiterhin können Plattenepithelkarzinome ein verhornendes oder nicht-verhornendes Wachstum zeigen (Böcker, 2012).

Histologisch finden sich relativ große, spindelzellige oder polygonale Tumorzellen, die sowohl eine atypische Kernmorphologie als auch atypische Mitosefiguren zeigen. Anhand dieser wird der mikroskopische Differenzierungsgrad des Tumors beurteilt. Bei verhornenden Tumoren zeigen sich in der mikroskopischen Betrachtung konzentrische Hornperlen oder eine Einzelverhornung (Böcker, 2012).

Bei einem Carcinoma in situ zeigt sich die Basallamina intakt, während diese bei einem invasiven Karzinom durchbrochen ist und sich inselartige Tumornester im gesunden Gewebe finden (Böcker, 2012).

2.1.5 Diagnostik

Das Plattenepithelkarzinom des Hals-Kopf-Bereichs zeigt sich oft lange Zeit symptomlos, sodass die Diagnose in fast der Hälfte der Fälle erst in fortgeschrittenen Stadien möglich ist (Kaatsch et al., 2017; Mast, 2014). Kommt es zu Symptomen, berichten Patienten typischerweise über Schluckbeschwerden, Fremdkörpergefühl oder persistierende Heiserkeit, häufig ist das Erstsymptom auch eine Schwellung im Bereich des Halses als Zeichen einer lymphatischen Metastasierung.

Zur Diagnosestellung sollte bei Verdacht auf ein HNSCC eine klinische Untersuchung inklusive Spiegeluntersuchung durch den Hals-Nasen-Ohrenarzt erfolgen, ergänzend können bildgebende Untersuchungen wie die Sonographie, Magnetresonanztomographie (MRT) und Computertomographie (CT) erfolgen, bei speziellen Fragestellungen kommen auch Angiografie oder Positronen-Emissions-Tomographie in Kombination mit CT oder MRT (PET-CT/MRT) in Frage. Sollte sich hierbei der Verdacht auf ein malignes Geschehen erhärten, sollte die Sicherung der Diagnose über eine Probeexzision, z. B. im Rahmen einer Panendoskopie erfolgen (Mast, 2014).

2.1.6 Therapie

Grundsätzlich stehen für die Therapie des HNSCC verschiedene Therapiemodalitäten zur Verfügung: neben den klassischen Therapieformen wie der Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie wurden in den letzten Jahren auch zielgerichtete Therapien mittels sogenannter „Biologicals“ entwickelt (Kundu & Nestor, 2012).

Da jede dieser Therapieformen mit teils starken Nebenwirkungen oder Einschränkungen einhergeht, muss die Therapie an den Patienten in Bezug auf Tumorstadium und Patientenwunsch angepasst werden, wozu sich interdisziplinäre Tumorkonferenzen etabliert haben (Kimmeyer et al., 2016).

Im Rahmen von chirurgischen Therapiekonzepten sollte grundsätzlich immer

eine vollständige Resektion des Tumors im Gesunden erfolgen (R0, s.o.), was beispielsweise mittels intraoperativer Schnellschnittdiagnostik verifiziert werden kann. Zusätzlich müssen aber auch die vielfältigen funktionellen Aspekte der Kopf-Hals-Region bedacht werden, wie beispielsweise die Schluck- und Atemwegsfunktion, welche bei einer chirurgischen Therapie geschont oder wiederhergestellt werden müssen. Nicht zuletzt müssen hierbei auch ästhetische Aspekte und individuelle Ansprüche berücksichtigt werden. Gerade Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien zeigen eine erhöhte Rate an lokoregionären Rezidiven, sodass sich in solchen Fällen eine adjuvante Radio(chemo)therapie nach chirurgischer Resektion etabliert hat (Mast, 2014). Besteht der klinische Verdacht auf eine bereits stattgefundene lymphatische Metastasierung, ist im Rahmen chirurgischer Therapiekonzepte eine Entfernung der betroffenen Halslymphknoten und anderer infiltrierter Strukturen indiziert (Neck Dissection, ND). In der Regel werden in einem solchen Fall auch makroskopisch nicht befallene Lymphknoten entfernt, um keine klinisch „unsichtbaren“ Metastasen zurückzulassen. Aufgrund solcher okkulten Metastasen wird vor allem bei lokal fortgeschrittenen Befunden eine Neck Dissection auch bei initialen cN0-Befunden empfohlen (Mast, 2014). Bei chirurgisch nicht resektablen Befunden stellt die primäre Radiochemotherapie eine Therapieoption dar. Auch Patienten, die eine operative Therapie ablehnen, können mit einer solchen Therapie in kurativer Intention behandelt werden (Mast, 2014). Die Radiochemotherapie kann auch im Rahmen palliativer Therapiekonzepte zum Einsatz kommen. Gerade in diesem Setting kann im Rahmen einer sogenannten zielgerichteten Therapie auch die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Erbitux® (Cetuximab, Merck) erfolgen (Kundu & Nestor, 2012). Gerade im Rahmen der Palliation kommt der Immuntherapie mit sogenannten Checkpoint-Inhibitoren eine steigende Bedeutung zu, beispielsweise mit dem anti-PD(programmed death)-1-Antikörper Nivolumab (Moreira, Tobias, O'Brien, & Agulnik, 2017).

2.1.7 Prognose

Die Prognose von Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs ist abhängig von der Lokalisation des Primarius, dessen Größe und Volumen, wie

auch vom Stadium der Erkrankung. Zusätzlich spielen weitere Faktoren eine Rolle, wie das Grading des Tumors oder die Infiltration von Lymphgefäßen und -knoten, speziell bei kapselüberschreitendem Wachstum der Metastasen. Im Rahmen der chirurgischen Therapie stellt auch die Qualität der Resektion einen wichtigen Prognosefaktor dar: erfolgt die Resektion nur knapp im Gesunden oder erfolgt eine unvollständige Resektion des Tumors, ist dies mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Lehnerdt et al., 2010).

Insgesamt ist die Prognose von oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen schlecht. Auch aufgrund der oft späten Diagnose liegt die 5-Jahres-Überlebensrate auch in Deutschland unter 50% (Kaatsch et al., 2017).

2.2 Molekulare Grundlagen

2.2.1 Molekularpathologie

Wie oben bereits beschrieben, sind die genauen Ursachen für die Entstehung eines HNSCC bis heute unklar. Bereits vor einiger Zeit wurde allerdings ein Modell zur Entstehung von Karzinomen aus normalem Plattenepithel beschrieben (siehe Abb. 1). Hierbei kommt es durch Punktmutationen, Deletionen und Genamplifikationen zur Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen, sowie zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wodurch die schrittweise Entartung von gesundem Epithel zu Karzinomen begünstigt wird (Califano et al., 1996). Wichtige Tumorsuppressorgene sind beispielsweise p16^{INK4a}, p14^{ARF} und p53, während als (Proto)Onkogene Cyclin D1 oder EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) zu nennen sind. Auch durch epigenetische Effekte kann über Hyper- oder Hypomethylierung von Genpromotern eine Karzinomentstehung begünstigt werden (Campo-Trapero et al., 2008).

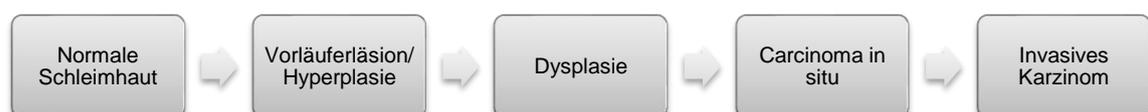


Abbildung 1: Modell der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren, modifiziert nach Califano (Califano et al., 1996)

Neben dieser klassischen Theorie zur Tumorentstehung müssen HPV positive Karzinome gesondert betrachtet werden. Hier zeigt sich beispielsweise meist ein nicht-mutierter p53 Wildtyp, da das Virus über seine onkogenen Proteine E6

und E7 Tumorsuppressorgene inaktiviert und so die Karzinogenese begünstigt (Leemans, Braakhuis, & Brakenhoff, 2011).

2.2.2 Humanes Papillomavirus

Humane Papillomaviren (HPV) sind eine Gruppe von DNA-Viren, von denen bereits mehr als 100 Typen beschrieben wurden. Sie sind kleine, nicht-behüllte Viren und bestehen aus zirkulärer Doppelstrang-DNA von ca. 8000 Basenpaaren Größe. Einige Subtypen wurden als Risikofaktoren für die Entstehung von verschiedenen Karzinomen identifiziert. Anhand ihres onkogenen Potentials werden die einzelnen Subtypen in „low-“ bzw. „high-risk“-Typen eingeteilt. Humane Papillomaviren befallen zu einem Großteil den Genitaltrakt und sind hier mit benignen und malignen Veränderungen assoziiert. Zu letzteren zählt klassischerweise das Cervixkarzinom, hier wurden schon frühzeitig die Subtypen 16 und 18 als onkogene Faktoren beschrieben (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2007).

Auch in Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs, hauptsächlich in Oropharynx-Karzinomen, lassen sich in circa einem Viertel der Fälle HP-Viren finden. Hierbei scheint besonders der Subtyp 16 vermehrt aufzutreten, es wurden aber auch andere Typen beschrieben (Ragin et al., 2007). Patienten mit HPV-positiven Tumoren weisen häufig nicht die klassischen Risikofaktoren wie Alkohol- und Nikotinabusus auf (Lindel, Beer, Laissue, Greiner, & Aebersold, 2001). Studien zeigten außerdem, dass Patienten mit HPV-positiven Tumoren in jüngerem Alter erkranken und einen prognostisch günstigeren Krankheitsverlauf besitzen als Patienten mit HPV-negativen Tumoren (Ritchie et al., 2003). Ebenso wurde bei diesen Patienten ein besseres Ansprechen auf Strahlentherapie verzeichnet (Lindel et al., 2001).

2.2.3 Der NOTCH-Signalweg

Die NOTCH-Rezeptorfamilie umfasst bei Menschen vier verschiedene Transmembranrezeptoren, NOTCH1-4. Die Rezeptoren können durch zwei Ligandengruppen aktiviert werden, welche selbst Familien von Transmembranrezeptoren sind, Delta-like ligands (DLL1, 3, 4) und Jagged ligands (JAG1, 2). Daraufhin wird die intrazelluläre Domäne des Rezeptors

abgespalten (NOTCH-ICN). Diese wandert in den Zellkern und reguliert dort die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, unter anderem von HES (Hes Family BHLH Transcription Factor 1) und HEY (Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 1) (Ntziachristos, Lim, Sage, & Aifantis, 2014).

Ein Einfluss des NOTCH-Signalweges auf Tumorerkrankungen wurde erstmals für die akute lymphatische Leukämie mit T-lymphozytärer Differenzierung (T-ALL) beschrieben (Ellisen et al., 1991). Hier finden sich in über der Hälfte aktivierende Mutationen von NOTCH1, sodass von einer onkogenen Funktion des NOTCH-Signalweges ausgegangen wird (Weng et al., 2004). Auch im Rahmen von soliden Tumoren, wie beispielsweise dem Adenokarzinom der Lunge, wurde die Aktivierung des NOTCH-Signalwegs als ein Hauptfaktor der Karzinogenese gefunden (Ntziachristos et al., 2014).

Weitere Untersuchungen zeigten aber noch ein anderes Bild des NOTCH-Signalweges. So wurde beispielsweise beschrieben, dass eine hohe Expression des NOTCH-Signalweges eine tumorsuppressive Wirkung in der Haut über Zellzyklusarrest und Zelldifferenzierung zeigt (Lobry, Oh, & Aifantis, 2011). Bei Untersuchungen zeigten sich in Plattenepithelkarzinomen der Lunge, im Gegensatz zum Adenokarzinom, Mutationen, die mit einer Inaktivierung des NOTCH-Signalweges einhergehen (sog. loss-of-function Mutationen), sodass auch hier von einer Tumorsuppressorfunktion des NOTCH-Signalweges ausgegangen wird. Die molekularen Vorgänge sind hierbei allerdings noch nicht genau bekannt. Studien über das hepatozelluläre Karzinom (HCC) fanden Hinweise darauf, dass eine Inaktivierung des NOTCH-Signalweges zu einer vermehrten Aktivierung des onkogenen Wnt-Signalweges führt, während eine hohe NOTCH-Expression über Suppression des Retinoblastom- (Rb)-Proteins tumorsuppressiv wirkt (Ntziachristos et al., 2014).

Neben den eben aufgezählten Tumorentitäten scheint der NOTCH-Signalweg auch in Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs mit der Karzinogenese in Zusammenhang zu stehen. So zeigten sich in einer Untersuchung von HNSCC-Exomen bei 15% der untersuchten Karzinome inaktivierende Mutationen von NOTCH1 (Agrawal et al., 2011). Auch bei Betrachtung der Expression ergaben sich Hinweise auf eine Dysregulation des NOTCH-Signalweges bei HNSCC (Sun et al., 2014). Die genauen

Auswirkungen des NOTCH-Signalweges auf die Erkrankung sind allerdings noch nicht vollends erforscht.

2.2.4 Zielsetzung der Arbeit

Da das Plattenepithelkarzinom des Hals-Kopf-Bereichs weiterhin mit einer schlechten Prognose einhergeht und die zur Verfügung stehenden Therapien durch funktionelle und ästhetische Einschnitte die Lebensqualität der betroffenen Patienten teils stark beeinträchtigen, ist dringend ein genaueres Verständnis der Erkrankung nötig. Auf diese Weise können in Zukunft neue Therapien entwickelt werden und den Patienten aufgrund genauerer Risikostratifizierung eine individuelle Therapie angeboten werden.

Dazu sollen in dieser Arbeit die Auswirkungen des NOTCH-Signalweges auf den Krankheitsverlauf von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs anhand eines großen Patientenkollektivs untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientenkollektiv

Im Zuge der Arbeit wurde ein Kollektiv bestehend aus 195 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich aus den Jahren 2002-2005 und 30 tumorfreien Patienten (2002-2011) untersucht. Alle Patienten wurden in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München diagnostiziert oder behandelt. Die Studie wurde von dem unabhängigen klinischen Ethikkomitee genehmigt, Projektnummer 1420/05.

3.1.2 Kits

Die für die Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 6 aufgeführt.

| Kit | Hersteller |
|--|---|
| p16 ^{INK4a} CINtec® Histology Kit | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany |
| InviTrap Spin Tissue RNA-Mini Kit | Stratec Molecular GmbH, Berlin |

Tabelle 6: Verwendete Kits

3.1.3 Reagenzien

In Tabelle 7 sind die verwendeten Reagenzien und deren Hersteller aufgeführt.

| Reagenz | Hersteller |
|--|---|
| Agarose | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Tween 20 Sodiumdodecylsulfat (SDS) Ethanol \geq 99,5% p.a. HCl 2 N Xylol (Isomere) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Maxima® reverse Transkriptase | Fermentas / Thermo Scientific, Waltham |
| peqGreen DNA- und RNA-Farbstoff SYBR Green KAPPA SYBR fast PCR Universal Mastermix | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Hexanucleotide Mix 10x conc. Proteinase K Tissue Lysis Buffer | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim |

Tabelle 7: Verwendete Reagenzien

3.1.4 Reagenzien und Puffer

In Tabelle 8 sind die in der Arbeit verwendeten gemischten Reagenzien und Puffer aufgeführt.

| Gemische und Puffer | Inhalt |
|--------------------------------|---|
| 10% SDS | 10 g Sodiumdodecylsulfat ad 100 ml H ₂ O bidest. |
| 10% Tween 20 | 100 ml Tween 20 ad 900 ml H ₂ O bidest. |
| Proteinase K-Puffer + Tween 20 | 250 μ l Tween 20 ad 50 ml Proteinase K |

Tabelle 8: Gemischte Reagenzien und Puffer

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 9 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

| Produkt | Hersteller |
|--|---|
| PCR Platten PCR Folien | 4titude® Limited, Wotton |
| Parafilm® | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim |
| Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen |
| Mikrotomklingen Blade S35 | Novoglas Labortechnik, Bern |
| Pipetten-Spitzen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Biosphere Micro Tubes 1,5 ml Reaktionsgefäße (Tubes) 15 ml, 50 ml | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| Objekträger Superfrost Plus Deckgläser 24x60 mm | Thermo Scientific, Waltham |

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

3.1.6 Verwendete Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 10 zu finden.

| Gerät | Hersteller |
|--|--|
| C1000 Thermo Cycler mit CFX96 Real Time Engine | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Accu-Jet® pro | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim |
| Heizblock Techne® Dri-Block® DB-2A | Cole-Parmer, Vernon Hills, USA |
| Centrifuge 5415 D Zentrifuge 5430R Thermomixer comfort Eppendorf Research Pipetten 1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl | Eppendorf AG, Hamburg |
| Magnetrührer RCT basic MS2 Minishaker Rüttler Vibrax VXR | IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Laborabzug | Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze |
| Leica Mikroskop DMI6000 B Leica Mikroskopkamera DFC425 C | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar |
| Kühlschrank comfort Gefrierschrank Premium No frost | Liebherr, Biberach an der Riss |
| Kühlplatte Objektträgerstrecktisch OTS 40 Paraffin-Streckbad TFB 35 | Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf |
| Trockenschrank | Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Mikrowelle | ok., Media-Saturn-Holding, Ingolstadt, Deutschland |
| Elektrophoresekammer PCR Elektrophorese Powersupply E-Box VX2 NanoDrop 1000 Spectrophotometer Pipette® 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Basic Elektrowaage BA 1105 | Sartorius AG, Göttingen |
| Präzisionswaage SBC 32 | Scaltec, Heiligenstadt |
| Mikrotom Microm HM355S | Thermo Scientific, Walham |

Tabelle 10: Verwendete Geräte

3.1.7 Computersoftware

Die verwendeten Computerprogramme sind in Tabelle 11 aufgelistet.

| Software | Entwickler |
|-------------------------------------|--|
| Biorad CFX-Manager | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Endnote Version X7, X8 | Clarivate Analytics, Philadelphia, USA |
| SPSS Statistics Version 23, 24, 25 | IBM GmbH, Ehningen, Deutschland |
| Leica Application Suite LAS V3.8 | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Microsoft® Office 2010, Office 2016 | Microsoft Corporation, Redmond, USA |
| Primer-BLAST | National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA |
| NanoDrop 1000 | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |

Tabelle 11: Computersoftware

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl der Gewebeproben

Die für die Arbeit verwendeten Gewebeproben wurden über die histologische Kennnummer identifiziert. Diese konnte aus den Berichten des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie am Klinikum rechts der Isar über das SAP-System ausgelesen werden und ermöglichte das Auffinden der Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebeproben (FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded (With, Evers, & Mason, 2011)) im Archiv des Instituts für Pathologie.

Mittels Mikrotom wurden von den Paraffinblöcken 1,5 µm dicke Schnitte angefertigt und über ein 42°C warmes Streckbad auf Objektträger aufgezogen. Das Material wurde entparaffiniert, hydriert und anschließend zur mikroskopischen Beurteilung mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefärbt. Bei der Beurteilung wurde darauf geachtet, dass nur Fälle mit einem ausreichend hohen Verhältnis von Tumor- zu Normalgewebe ausgewählt wurden. Bei Fällen mit mehreren Tumorblöcken wurde der jeweils am besten geeignete Block für die weitere Arbeit ausgewählt. Ebenso wurden geeignete

Gewebeblöcke mit tumorfremem Gewebe als Vergleichskollektiv identifiziert und beurteilt. Hierbei wurde auf eine vergleichbare Verteilung der Lokalisation der Gewebeproben geachtet (s.u.).

3.2.2 RNA-Isolierung aus FFPE-Material

Zur Durchführung der quantitativen Real-Time PCR wurde aus den Gewebeproben RNA isoliert.

Je nach Größe der eingebetteten Gewebeprobe wurden ein bis acht 10 µm dicke Schnitte angefertigt und direkt in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 800 µl Xylol hinzugegeben und das Gemisch homogenisiert. Nach Zugabe von 400 µl Ethanol und erneuter Homogenisierung wurde die Probe für 4 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, zur Probe wurde 1 ml Ethanol hinzugegeben, homogenisiert und erneut für 4 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß mit dem Zellpellet zum Trocknen in einen Heizblock bei 55 °C gestellt.

Zu dem getrockneten Pellet wurden 100 µl Proteinase K-Puffer + Tween 20, 16 µl 10% SDS und 40 µl Proteinase K gegeben. Dabei wurde das Pellet mit einer abgeknickten 100 ml-Pipettenspitze aufgelockert. Die Suspension wurde bei 55 °C und 450 rpm im Heizblock über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die oben genannten Reagenzien erneut in gleicher Menge hinzugefügt und das Gemisch für eine weitere Nacht inkubiert.

Zur Aufreinigung wurde am dritten Tag zu der Probe 600 µl Lysis Solution TR gegeben, die mit 2-Mercaptoethanol im Verhältnis 1:100 gemischt worden war. Nach Homogenisierung wurde die Probe 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zum Entfernen der DNA wurden 500 µl des Überstandes in ein 2 ml Receiver Tube überführt und 330 µl Ethanol zugegeben und vermischt. Das Lysat wurde komplett auf ein RTA Spin Filter Set gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert (Vorgehen identisch bei nachfolgenden Inkubationen) und anschließend bei 10500 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und 500 µl Wash Buffer R1 auf den Spin Filter gegeben. Nach erneuter Inkubation wurde die Probe bei 10500 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert und der Spin Filter auf ein neues Receiver Tube gesetzt. Anschließend wurden 600 µl Wash Buffer R2 auf den Spin Filter gegeben, inkubiert und 30 Sekunden bei 10500 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde zweimal

wiederholt. Danach wurde der Spin Filter durch 5 minütige Zentrifugation bei 12000 rpm getrocknet und anschließend auf ein RNase freies Elution Tube gesetzt. Auf den Filter wurden nun 50 µl Elution Buffer R gegeben, 2 Minuten inkubiert und eine Minute bei 10500 rpm zentrifugiert. Der Filter wurde verworfen und die Konzentration der RNA vor dem Einfrieren bei -20 °C mittels NanoDrop 1000 gemessen.

3.2.3 Synthese cDNA

Aus der zuvor isolierten RNA wurde für die weiteren Analysen cDNA synthetisiert.

Hierzu wurden auf Eis 250 ng bzw. 100 ng RNA in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit destilliertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt.

Anschließend wurden zwei Mastermixe angefertigt, siehe Tabelle 12 und 13.

| Reagenz | Menge |
|------------|--------|
| Hexamere | 1 µl |
| dNTPs | 1 µl |
| Aqua dest. | 2,5 µl |

Tabelle 12: cDNA Mastermix 1

| Reagenz | Menge |
|------------|--------|
| Maxima RT | 1 µl |
| 5x Buffer | 4 µl |
| Aqua dest. | 0,5 µl |

Tabelle 13: cDNA Mastermix 2

Danach wurde der Mastermix 1 (4,5 µl) zu der RNA gegeben und im Heizblock bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Mastermix 2 (5,5 µl) hinzugegeben und das Gemisch zuerst bei 25 °C für 10 Minuten und hierauf für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Abkochen des Gemisches für 5 Minuten bei 85 °C abgeschlossen und die fertige cDNA bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.4 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR), erstmals beschrieben 1985 (Saiki et al., 1985), ermöglicht die Amplifikation bekannter DNA-Abschnitte *in vitro*.

Zur Durchführung einer PCR werden neben der zu untersuchenden DNA-Probe

zwei Primer aus Oligonucleotiden, eine thermostabile Polymerase (wie bspw. die taq-Polymerase), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), eine Pufferlösung und Mg²⁺-Ionen benötigt.

Der erste Schritt der Reaktion ist die Denaturierung bei 95 °C. Hierbei wird der DNA-Doppelstrang in seine beiden Einzelstränge aufgetrennt, sodass sich im zweiten Schritt, dem Annealing, die Primer an die DNA anlagern können. Die Temperatur, bei dem das Annealing stattfindet, ist abhängig von den verwendeten Primern. Abschließend erfolgt die Elongation, bei der durch die Polymerase ausgehend von den Primern komplementäre dNTPs angelagert und verknüpft werden.

Die drei Schritte werden anschließend so oft wiederholt, bis der gewünschte DNA-Abschnitt in ausreichender Menge vervielfältigt ist.

3.2.5 Etablierung der Primer

Da RNA, die aus FFPE-Material isoliert wurde, deutlich stärker fragmentiert ist als RNA aus Frischgewebe (Dietrich et al., 2013), wurden PCR-Primer mit einer kurzen Amplikon-Länge gesucht und etabliert. Durch eine Gradienten-PCR und Auftrennung der Amplifikate mittels Gelelektrophorese wurde die spezifische Annealingtemperatur bestimmt. Die verwendeten Primer und ihre Annealingtemperatur sind in Tabelle 14 aufgeführt. Die Sequenzen und Temperaturen der Primer für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) (Kwon et al., 2009) und JAG1 (Jagged 1) (Man et al., 2012) wurde aus der Literatur übernommen, die übrigen Primer den Bedürfnissen entsprechend designt.

| Gen | Temperatur | Sequenz | Größe |
|--------|------------|--|-------|
| NOTCH1 | 62,0 °C | Forward: TGAATGGCGGGAAGTGTGAAG Reverse: GGTTGGGGTCCTGGCATCG | 90 bp |
| NOTCH3 | 63,0 °C | Forward: ATGGTATCTGCACCAACCTGG Reverse: GATGTCCTGATCGCAGGAAGG | 83 bp |
| HES1 | 57,0 °C | Forward: AAGAAAGATAGCTCGCGGCA Reverse: CGGAGGTGCTTCACTGTCAT | 71 bp |
| HEY1 | 64,0 °C | Forward: CCGACGAGACCGGATCAATA Reverse: GCTTAGCAGATCCCTGCTTCT | 83 bp |
| JAG1 | 56,3 °C | Forward: ATCGTGCTGCCTTTCAGTTT Reverse: TCAGGTTGAACGGTGTCATT | 98 bp |
| GAPDH | 56,0 °C | Forward: AGCCACATCGCTCAGACA Reverse: GCCCAATACGACCAAATCC | 66 bp |

Tabelle 14: Verwendete Primer

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der vorhandenen DNA-Fragmente im PCR-Produkt wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Agarose bildet hierbei ein Netz im Gel, an dem die negativ geladenen Nukleinsäure-Fragmente entlang wandern können. Legt man anschließend eine Spannung an, wandern die Fragmente in Richtung des positiv geladenen Pols. Durch die Netzstruktur geschieht dies umso schneller, je kleiner die Fragmente sind, während große Fragmente langsamer wandern.

Aufgrund der geringen zu erwartenden Größe der Fragmente wurde die Elektrophorese in dreiprozentigem Agarosegel durchgeführt. Dazu wurden 3 g Agarose in 100 ml 1x TBE erhitzt und gelöst. Nachdem das Gemisch etwas abgekühlt war, wurden 8 µl DNA-Farbstoff (peqGreen) hinzugefügt und das Gel gegossen.

Nach der Polymerisation des Gels wurde dieses mit je 10 µl PCR-Produkt und 2 µl Ladepuffer beladen. Zum Größenvergleich wurden 1,5 µl Marker mit 8,5 µl Aqua und 2 µl Ladepuffer aufgetragen.

Die Laufzeit des Gels betrug 2,5 Stunden bei einer angelegten Spannung von 90 mV. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels E-Box. Die Temperatur,

bei der die Bande für die erwartete Fragmentgröße am deutlichsten und ohne unspezifische Amplifikate vorhanden war, wurde für die weiteren Versuche als Annealingtemperatur verwendet.

3.2.7 Quantitative real-time PCR

Um neben dem qualitativen Nachweis auch eine Quantifizierung des PCR-Produkts vornehmen zu können, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Bei dieser Methode, erstmals beschrieben von (Higuchi, Dollinger, Walsh, & Griffith, 1992), wird dem PCR-Ansatz ein fluoreszierender Farbstoff hinzugegeben, der im Laufe der PCR in seiner Intensität analog zur Menge des PCR-Amplifikates exponentiell ansteigt, bevor die Intensität gegen Ende der Reaktion ihr Maximum erreicht und in eine Plateauphase übergeht.

Um anhand der Fluoreszenzkurve eine Aussage über die Menge an vorhandenem Material treffen zu können, wird der CT-Wert verwendet. Der CT-Wert beschreibt die Anzahl an Amplifikationszyklen, nach der ein definierter Fluoreszenzschwellenwert erreicht wurde. Je höher dabei die Expression eines untersuchten Gens ist, desto eher wird die Schwelle erreicht und desto niedriger ist der CT-Wert.

Da verschiedene Proben unterschiedliche Konzentrationen an Ausgangsmaterial aufweisen, werden diese anhand eines Housekeeping-Gens normalisiert. Dieses Gen soll in allen Zellen vorhanden und proportional zu der in der Probe enthaltenen Menge an RNA sein (Szabo et al., 2004). Als Housekeeping-Gen wurde das Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Zur Durchführung wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß ein Mastermix erstellt (Zusammensetzung siehe Tabelle 15, für GAPDH wurden nur 0,25 µl je Primer pro Probe verwendet und dafür 0,5 µl Aqua hinzugefügt) und je 18 (cDNA aus 100 ng RNA) bzw. 23 µl (cDNA aus 250 ng RNA) Mastermix und 5 bzw. 2 µl Template in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert.

| Reagenz | Volumen (cDNA 100ng) | Volumen (cDNA 250ng) |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| 2x KAPA SYBR FAST Universal | 12,5 µl | 12,5 µl |
| Aqua | 6,5 µl | 9,5 µl |
| Primer For. (20 pmol) | 0,5 µl | 0,5 µl |
| Primer Rev. (20 pmol) | 0,5 µl | 0,5 µl |

Tabelle 15: Mastermix real-time PCR

Zur Durchführung der PCR wurde im Bio-Rad CFX Manager folgendes Programm erstellt:

| Temperatur | Zeit |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1. 95 °C | 15 Minuten |
| 2. 95 °C | 30 Sekunden |
| 3. Annealing Temperatur s. Tab 14 | 30 Sekunden |
| 4. 72 °C | 30 Sekunden |
| 5. 75 °C – 95 °C | In 0,5 °C Schritten, je 5 Sekunden |

Tabelle 16: Programm real-time PCR

Die Schritte 2-4 wurden insgesamt 50-mal durchgeführt.

3.2.8 Immunhistochemie

Von den FFPE-Blöcken wurden mittels Mikrotom 1,5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen. Nach Trocknung über Nacht bei 58 °C wurden sie in einer Alkoholreihe mit absteigender Konzentration entparaffiniert sowie rehydriert, bevor die Färbung mit dem Antikörper erfolgte.

Für die Auswertung bezüglich der Expression von p16 wurde unter Berücksichtigung des Prozentsatzes der positiven Zellen (percentage points = PP) sowie der Intensität (staining intensity = SI) der Färbung ein Histoscore in Anlehnung an den Immunreaktiven Score (IRS) ermittelt (Schauer, Rothe, Balzer, Fiebig, & Rauschecker, 1988).

Zur Einteilung für PP und SI siehe Tabelle 17. Der finale Histoscore ergibt sich aus der Summe von PP und SI (Pickhard et al., 2014).

| Punkte | Einteilung PP | Einteilung SI |
|--------|-----------------|-----------------|
| 0 | Keine Anfärbung | Keine Anfärbung |
| 1 | < 10% | Schwach positiv |
| 2 | 11-30% | Mäßig positiv |
| 3 | 31-60% | Stark positiv |
| 4 | > 60% | |

Tabelle 17: Punkteverteilung für Histoscore

3.2.9 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen und Test wurden, soweit möglich, zweiseitig durchgeführt, mit einem Signifikanzniveau von 5%. Sämtliche Berechnungen wurde mittels SPSS (Version 23, 24 oder 25, IBM GmbH, Ehningen, Deutschland) angestellt. Zur Überlebenszeitanalyse wurden Kaplan Meier Analysen herangezogen, bei vergleichenden Kurven wurde die Signifikanz der Ergebnisse mittels Log-rank-Test berechnet. Die Höhe der mRNA-Expression wurde mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet. Die weitere Analyse des Einflusses der mRNA-Expression auf den klinischen Verlauf der Patienten wurde mittels multivariater Cox-Regression (forward stepwise) durchgeführt. Vergleiche der Expression zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test oder dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

4 Ergebnisse

Im Folgenden sollen die aus der Studie gewonnenen Ergebnisse näher charakterisiert werden.

4.1 Patientenkollektiv

Die Verteilung der HNSCC-Patienten nach Alter, TNM-Klassifikation, Lokalisation und Status von bekannten Noxen ist in Tabelle 18 aufgeführt, Tabelle 19 zeigt die Charakterisierung der tumorfreien Patienten. Hier wurden unter anderem im Rahmen einer Panendoskopie zum Ausschluss einer malignen Erkrankung Proben im HNO-Bereich gewonnen.

| | | | % |
|-------------------|----------------------------|----------|------|
| Alter | | | |
| | Min | 35 Jahre | |
| | Max | 89 Jahre | |
| | Mittelwert | 59Jahre | |
| | Median | 59Jahre | |
| Geschlecht | | | |
| | Männlich | 163 | 83,6 |
| | Weiblich | 32 | 16,4 |
| T | | | |
| | 1 | 46 | 23,6 |
| | 2 | 53 | 27,2 |
| | 3 | 50 | 25,6 |
| | 4 | 23 | 11,8 |
| | 4a | 21 | 10,8 |
| | 4b | 2 | 1,0 |
| N | | | |
| | 0 | 65 | 33,3 |
| | 1 | 30 | 15,4 |
| | 2 (nicht näher bezeichnet) | 4 | 2,1 |
| | 2a | 6 | 3,1 |

| | | | |
|---------------------|--------------|-----|------|
| | 2b | 49 | 25,1 |
| | 2c | 34 | 17,4 |
| | 3 | 6 | 3,1 |
| | X | 1 | 0,5 |
| M | | | |
| | 0 | 172 | 88,2 |
| | 1 | 8 | 4,1 |
| | X | 15 | 7,7 |
| Grading | | | |
| | G1 | 9 | 4,6 |
| | G2 | 95 | 48,7 |
| | G3/G4 | 91 | 46,7 |
| Lokalisation | | | |
| | Mundhöhle | 32 | 16,4 |
| | Oropharynx | 83 | 42,6 |
| | Hypopharynx | 38 | 19,5 |
| | Larynx | 42 | 21,5 |
| Alkohol | | | |
| | Kein/selten | 31 | 15,9 |
| | Regelmäßig | 153 | 78,5 |
| | Unbekannt | 11 | 5,6 |
| Nikotin | | | |
| | Nichtraucher | 22 | 11,3 |
| | Raucher | 166 | 85,1 |
| | Unbekannt | 7 | 3,6 |

Tabelle 18: Charakterisierung HNSCC-Patienten

| | | | % |
|---------------------|-------------|----------|------|
| Alter | | | |
| | Min | 25 Jahre | |
| | Max | 87 Jahre | |
| | Mittelwert | 52 Jahre | |
| | Median | 51 Jahre | |
| Geschlecht | | | |
| | Männlich | 18 | 60 |
| | Weiblich | 12 | 40 |
| Lokalisation | | | |
| | Oropharynx | 7 | 23,7 |
| | Hypopharynx | 17 | 56,7 |
| | Larynx | 6 | 20 |

Tabelle 19: Charakterisierung der tumorfreien Patienten

Die Analyse des Überlebens des Tumorkollektivs wird im Folgenden behandelt.

4.2 p16^{INK4}-Status

Wie zuvor beschrieben, wurde zur Bestimmung von HPV-assoziierten Tumoren der p16^{INK4}-Status mittels Immunhistochemie bestimmt. Aufgrund des hohen Verbrauchs an FFPE-Material für die RNA-Isolierung konnten nicht alle Fallproben entsprechend gefärbt werden. Von den 195 Tumorfällen konnten 168 (86,15 %) gefärbt werden, 27 (13,85 %) Fälle verblieben ungefärbt. Tabelle 20 zeigt die Auswertung anhand des oben beschriebenen Systems.

| Score | Häufigkeit | Prozent alle Fälle | Prozent gefärbt |
|-------|------------|--------------------|-----------------|
| 0 | 112 | 57,4 | 66,3 |
| 2 | 7 | 3,6 | 4,1 |
| 3 | 7 | 3,6 | 4,1 |
| 4 | 2 | 1,0 | 1,2 |
| 5 | 7 | 3,6 | 4,1 |
| 6 | 6 | 3,1 | 3,6 |
| 7 | 28 | 14,4 | 16,6 |

Tabelle 20: Auswertung der p16-Immunhistochemie

Um einerseits möglichst alle HPV-assoziierten Fälle zu erfassen, andererseits falsch-positive Einstufungen zu vermeiden, wurde ab einem Score von 3 eine positive Färbung angenommen. Abbildung 2 zeigt exemplarisch einen positiven sowie einen negativen Schnitt.

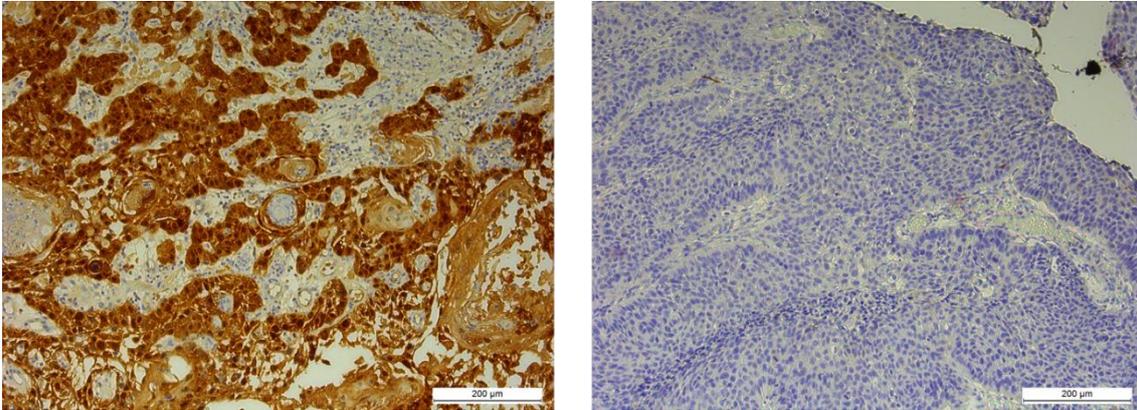


Abbildung 2: p16-positives (links) bzw. negatives (rechts) Plattenepithelkarzinom

So zeigten sich 50 Fälle p16-positiv (29,76 % der gefärbten Fälle bzw. 25,64 % des gesamten Kollektivs), während 118 Fälle als p16-negativ gewertet wurden (70,24 % der gefärbten Fälle bzw. 60,51 % des gesamten Kollektivs).

Der größte Anteil an p16-positiven Tumoren fand sich dabei im Bereich des Oropharynx mit 36 Fällen (43,4 % der Oropharynxkarzinome), gefolgt von 7 Fällen im Bereich des Larynx (16,7 % der Larynxkarzinome) und 4 im Bereich der Mundhöhle (12,5 % der Mundhöhlenkarzinome), während sich im Bereich des Hypopharynx lediglich drei p16-positive Karzinome fanden (7,9 % der Hypopharynxkarzinome).

4.3 Expression des NOTCH-Signalweges in Tumor- und Normalgewebe

Mittels der aus der quantitativen real-time PCR gewonnenen Ergebnisse wurde die relative Expression der oben beschriebenen Proteine des NOTCH-Signalweges in Tumor- und Normalgewebe verglichen. Für den Vergleich zwischen den beiden Gruppen wurde die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode verwendet. Tabelle 21 zeigt jeweils die kleinsten und größten $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte der einzelnen Gruppen, sowie den Median.

| | Normalgewebe | | | Tumorgewebe | | |
|---------------|--------------|------|--------|-------------|-------|--------|
| | Min | Max | Median | Min | Max | Median |
| NOTCH1 | 0,29 | 2,48 | 1,15 | 0,10 | 5,94 | 0,69 |
| NOTCH3 | 0,41 | 5,52 | 0,89 | 0,11 | 2,80 | 0,57 |
| HES1 | 0,33 | 9,97 | 0,85 | 0,16 | 3,21 | 0,69 |
| HEY1 | 0,26 | 3,99 | 0,85 | 0,01 | 15,57 | 1,24 |
| JAG1 | 0,18 | 3,13 | 1,10 | 0,19 | 3,63 | 0,92 |

Tabelle 21: $\Delta\Delta CT$ -Werte von Normal- und Tumorgewebe

Anschließend wurden die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf Signifikanz überprüft, hierfür wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet um die entsprechenden p-Werte zu berechnen.

In der Analyse zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression von mRNA von NOTCH1 ($p=0,003$), NOTCH3 ($p<0,001$) und HES1 ($p=0,049$) im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe. Bei den übrigen untersuchten Proteinen HEY1 und JAG1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe.

4.4 Überlebenszeitanalyse

Anschließend wurde das Überleben des Tumorkollektivs und eine mögliche Assoziation zwischen dem NOTCH-Signalweg und dem Krankheitsverlauf der Patienten untersucht. Hierzu wurden die $\Delta\Delta CT$ -Werte der einzelnen Proteine gruppiert. Eine hohe Expression wurde ab Werten angenommen, die mehr als eine Standardabweichung über dem Mittelwert der $\Delta\Delta CT$ -Werte des entsprechenden Proteins lagen, eine niedrige Expression analog dazu für Werte unter einer Standardabweichung unter dem Mittelwert. Anschließend wurden die einzelnen Proteine mittels Kaplan-Meier-Analyse sowohl im Hinblick auf Unterschiede im Gesamtüberleben (overall survival, OS), als auch bezüglich des krankheitsfreien Überlebens (disease-free survival, DFS) untersucht und die Signifikanz der Werte mittels Log-rank Test überprüft. Bezüglich des OS wurde als Ereignis ein tumorbezogenes Versterben in den ersten fünf Jahren nach Diagnose bzw. jeder Tod nach fünf Jahren follow-up gewertet. Bei der Betrachtung des DFS wurden lokoregionäre und Fernmetastasierung, sowie Zweitkarzinome als Ereignis gewertet.

Zeigten sich Unterschiede, wurde eine multivariate Cox-Regression (forward

stepwise) durchgeführt. In dieser wurden zusätzlich auch T-, N-, M-Klassifikation, Grading, p16-Status, Alter und Geschlecht der Patienten betrachtet.

4.4.1 Kollektiv

Die mittlere Überlebenszeit des untersuchten Kollektivs betrug 3,9 Jahre, die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 42,6%.

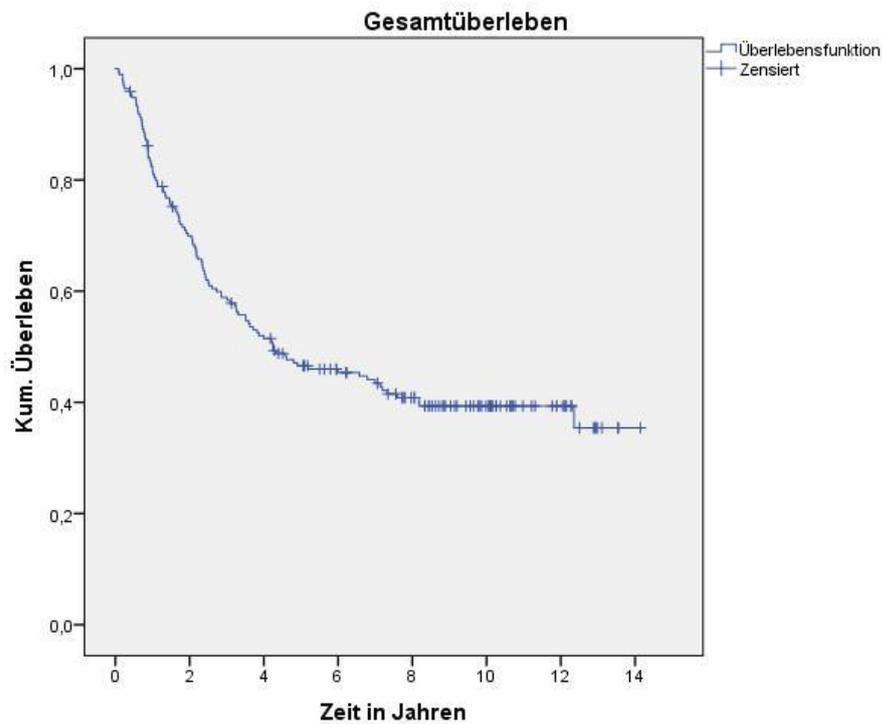


Abbildung 3: Gesamtüberleben des Tumorkollektivs

Bei der Betrachtung des krankheitsfreien Überlebens zeigte sich bei 38,5% der Patienten ein Ereignis in den ersten fünf Jahren.

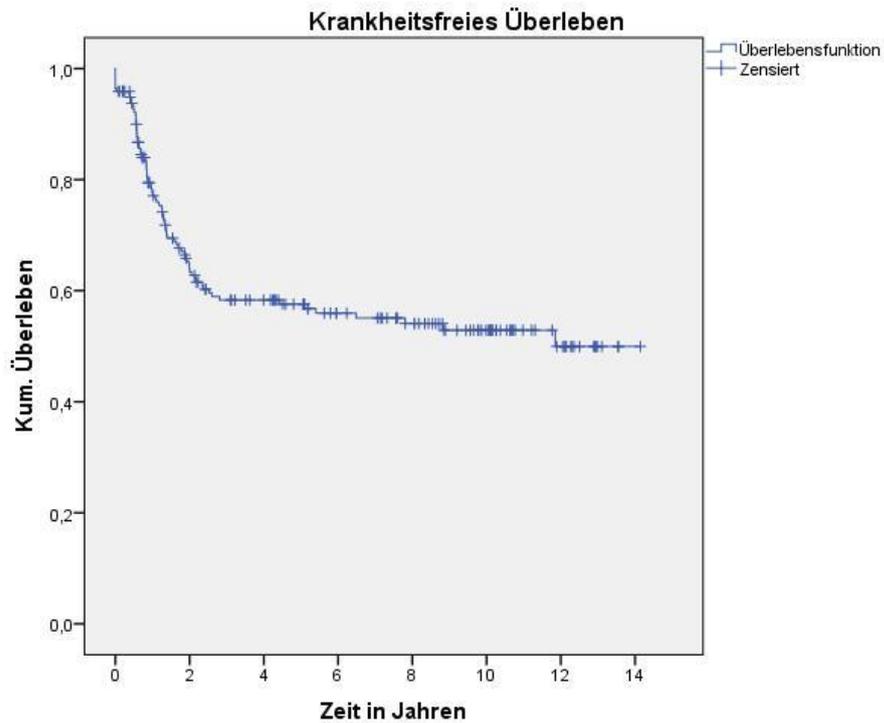


Abbildung 4: krankheitsfreies Überleben des Tumorkollektivs

4.4.2 p16-Status und Überleben

Im nächsten Schritt wurde der Zusammenhang zwischen p16-Status und Überleben bei den 168 gefärbten Fällen untersucht.

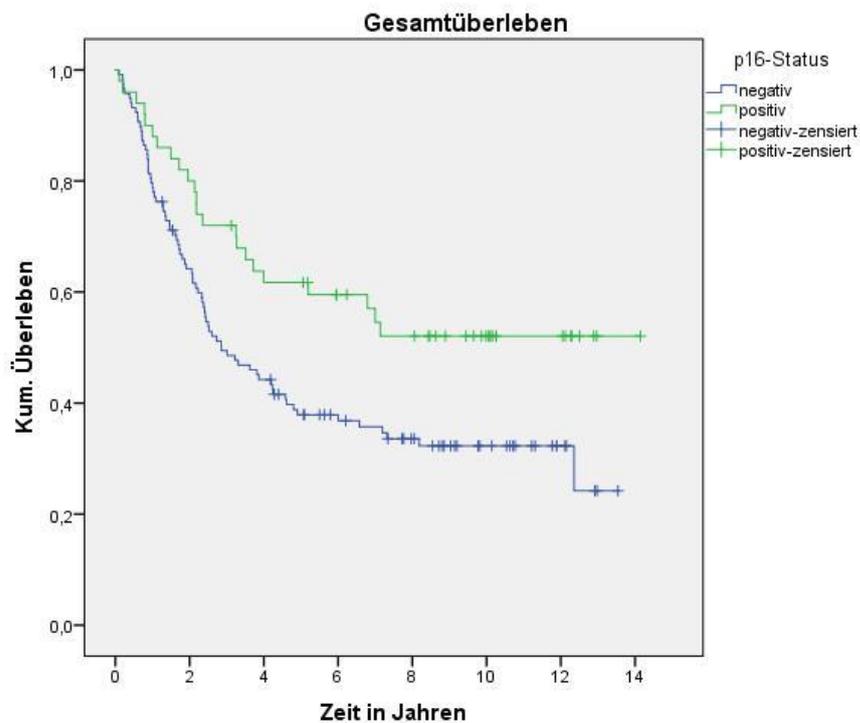


Abbildung 5: Gesamtüberleben in Bezug auf den p16-Status

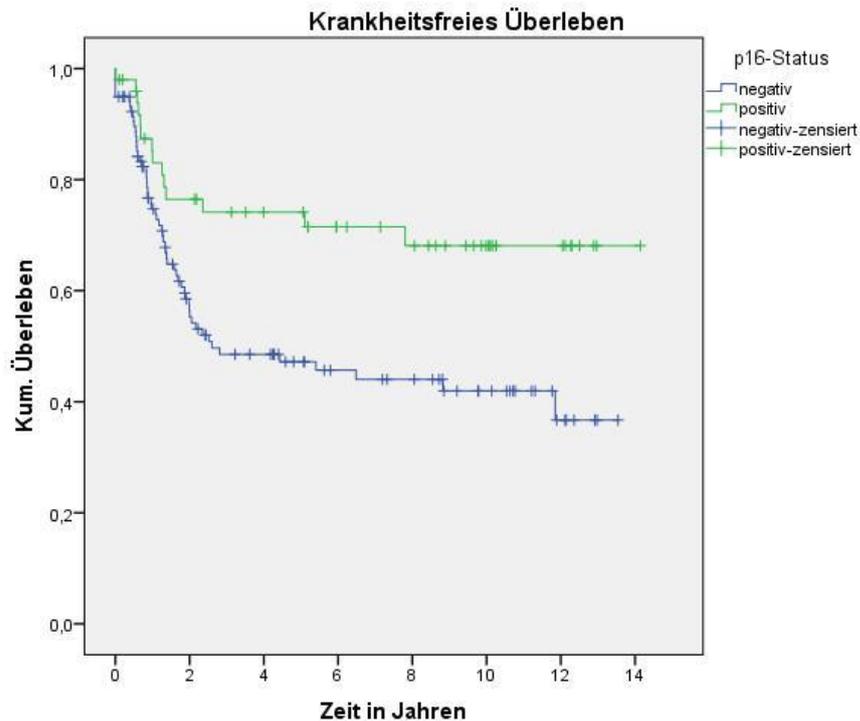


Abbildung 6: krankheitsfreies Überleben in Bezug auf den p16-Status

Hier zeigte sich ein signifikant besseres Überleben der Patienten mit p16-positiven Karzinomen, sowohl bezogen auf das OS ($p=0,01$) als auch auf das DFS ($p=0,005$).

4.4.3 NOTCH-Signalweg und Überleben

Anschließend wurden die Proteine des NOTCH-Signalweges betrachtet.

4.4.4 Gesamtüberleben

Patienten mit hoher Expression von NOTCH1 zeigten in der Kaplan-Meier-Analyse ein signifikant besseres Gesamtüberleben als Patienten mit niedriger und mittlerer Expression ($p=0,013$) (Tab. 22)

| Protein | Vergleich der Expression | p-Wert |
|---------|-------------------------------|--------|
| NOTCH1 | hoch gegen mittel und niedrig | 0,013 |
| | niedrig gegen mittel und hoch | 0,611 |
| NOTCH3 | hoch gegen mittel und niedrig | 0,568 |
| | niedrig gegen mittel und hoch | 0,633 |
| HES1 | hoch gegen mittel und niedrig | 0,268 |
| | niedrig gegen mittel und hoch | 0,590 |
| HEY1 | hoch gegen mittel und niedrig | 0,419 |
| | niedrig gegen mittel und hoch | 0,755 |
| JAG1 | hoch gegen mittel und niedrig | 0,461 |
| | niedrig gegen mittel und hoch | 0,322 |

Tabelle 22: Kaplan-Meier-Analyse mit Log-rank Test des Gesamtüberlebens

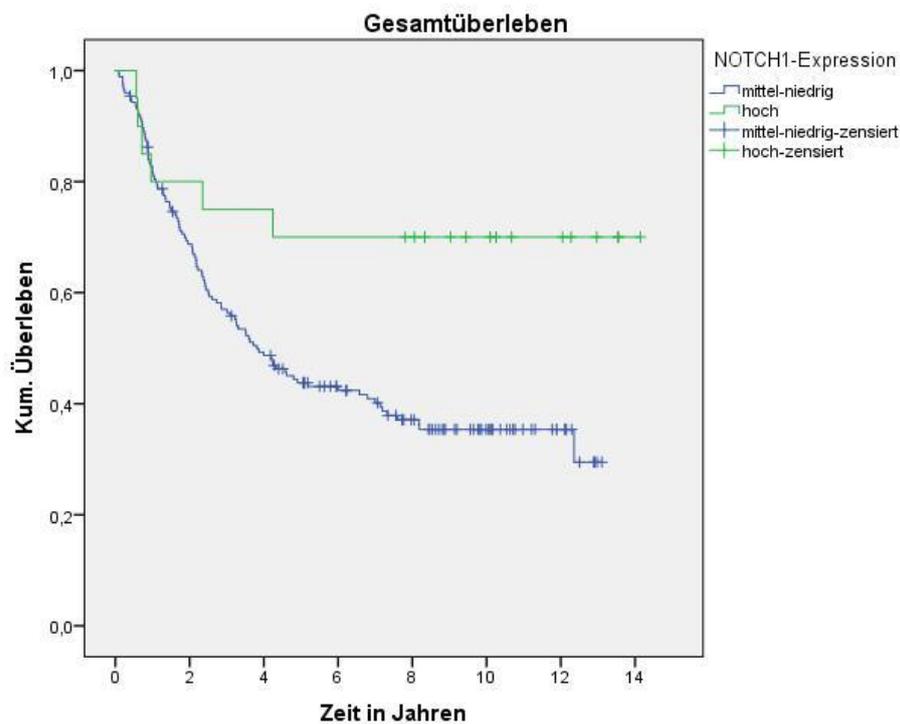


Abbildung 7: Gesamtüberleben in Bezug auf die NOTCH1-Expression

Der signifikante Unterschied bestätigte sich in der Cox-Regression. Die Hazard ratio betrug hierbei für die hohe NOTCH1-Expression 0,38, sodass auch hier eine hohe NOTCH1-Expression mit einem günstigeren Gesamtüberleben assoziiert war. Tabelle 23 zeigt die die in der Cox-Regression untersuchten signifikanten Faktoren mit Hazard ratio und p-Wert.

| Faktor | p-Wert | HR | 95 % CI |
|--------------------------------|---------------|-----------|----------------|
| N-Stadium | <0,01 | 3,29 | 2,09-5,18 |
| T-Stadium | <0,01 | 1,95 | 1,33-2,87 |
| Alter | 0,01 | 1,03 | 1,01-1,05 |
| p16 pos. Immunhistochemie | <0,01 | 0,42 | 0,26-0,69 |
| Hohe NOTCH1- RNA-Expression | 0,03 | 0,38 | 0,16-0,93 |

Tabelle 23: Hazard ratio, 95% Konfidenzintervall und p-Werte für die in der Cox-Regression untersuchten Faktoren bzgl. des Gesamtüberlebens

4.4.5 Krankheitsfreies Überleben

Auch in der Analyse des DFS zeigt sich somit, dass eine hohe NOTCH1-Expression mit einem besseren Überleben assoziiert ist (p=0,04).

| Protein | Vergleich der Expression | p-Wert |
|----------------|---------------------------------|---------------|
| NOTCH1 | hoch gegen mittel und niedrig | 0,040 |
| | niedrig gegen mittel und hoch | 0,673 |
| NOTCH3 | hoch gegen mittel und niedrig | 0,896 |
| | niedrig gegen mittel und hoch | 0,082 |
| HES1 | hoch gegen mittel und niedrig | 0,240 |
| | niedrig gegen mittel und hoch | 0,065 |
| HEY1 | hoch gegen mittel und niedrig | 0,077 |
| | niedrig gegen mittel und hoch | 0,040 |
| JAG1 | hoch gegen mittel und niedrig | 0,481 |
| | niedrig gegen mittel und hoch | 0,529 |

Tabelle 24: Kaplan-Meier-Analyse mit Log-rank Test des krankheitsfreien Überlebens

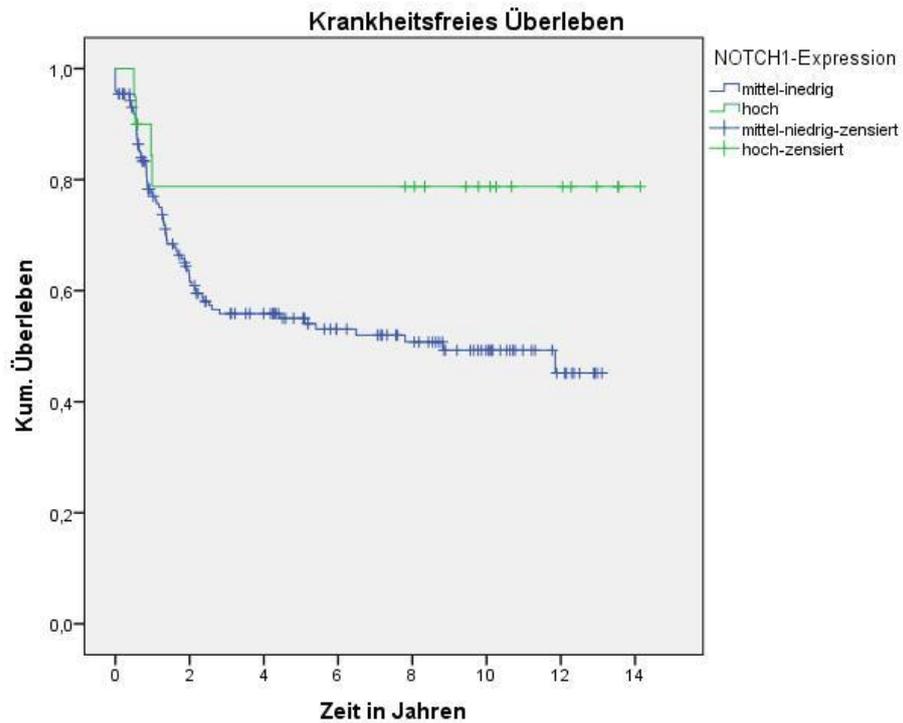


Abbildung 8: krankheitsfreies Überleben in Bezug auf die NOTCH1-Expression

Betrachtet man das NOTCH downstream target HEY1, so zeigt sich analog, dass eine niedrige Expression von HEY1 mit einem signifikant schlechteren krankheitsfreien Überleben einhergeht, verglichen mit einer mittleren/hohen Expression ($p=0,04$).

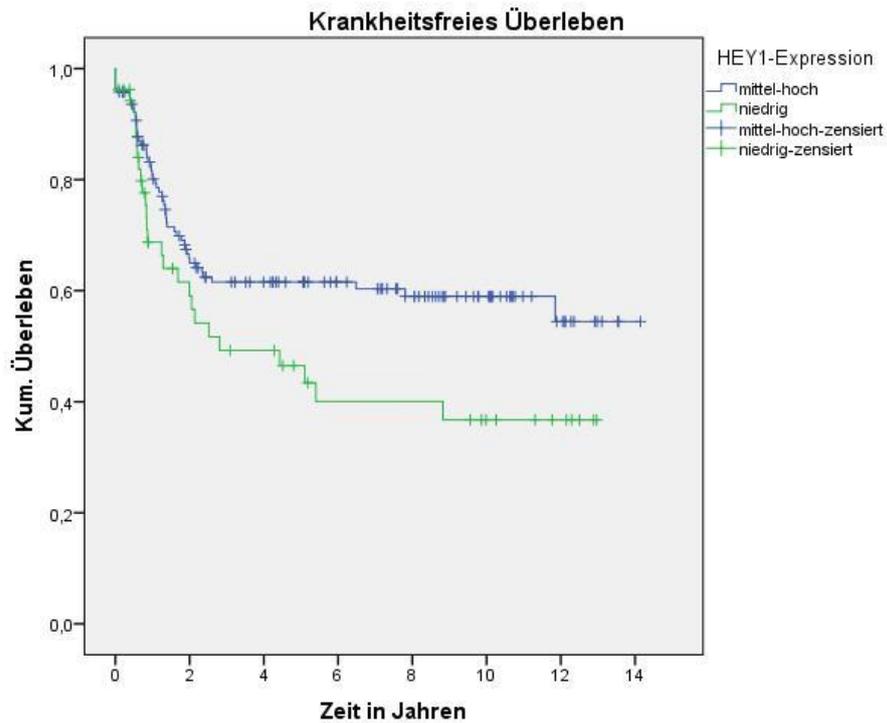


Abbildung 9: krankheitsfreies Überleben in Bezug auf die HEY1-Expression (zwei Gruppen)

Vergleicht man die drei Gruppen niedrig/mittel/hoch direkt untereinander, so zeigt sich auch hier, dass eine hohe HEY1-Expression mit einem signifikant besseren krankheitsfreien Überleben einhergeht als die mittlere Expression, während die Gruppe der niedrigen Expression das schlechteste DFS zeigt ($p=0,048$).

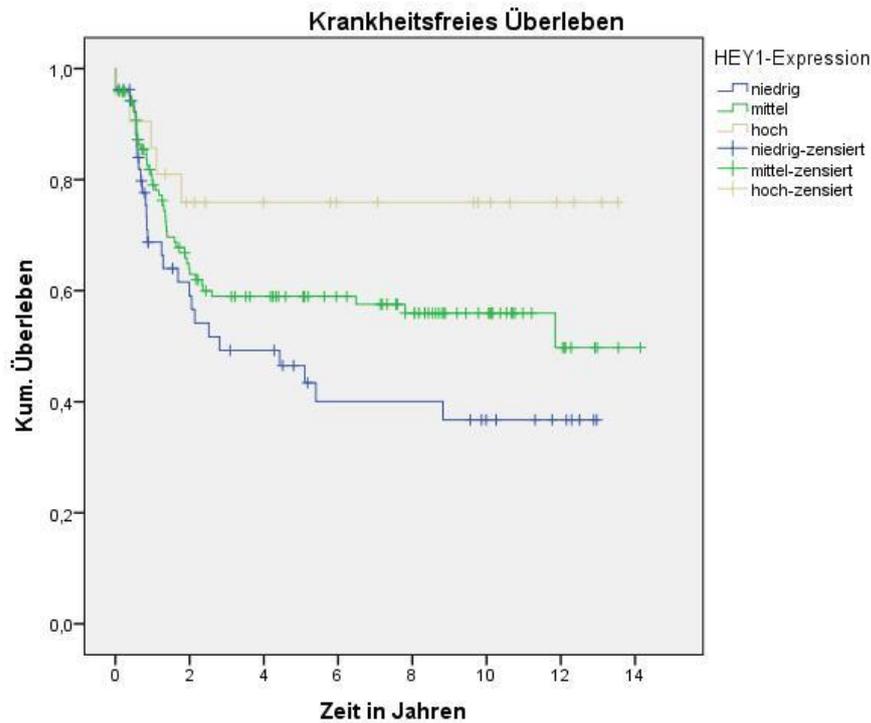


Abbildung 10: krankheitsfreies Überleben in Bezug auf die HEY1-Expression (3 Gruppen)

Derselbe Trend zeigt sich auch für HES1, das andere untersuchte NOTCH downstream target ($p=0,113$).

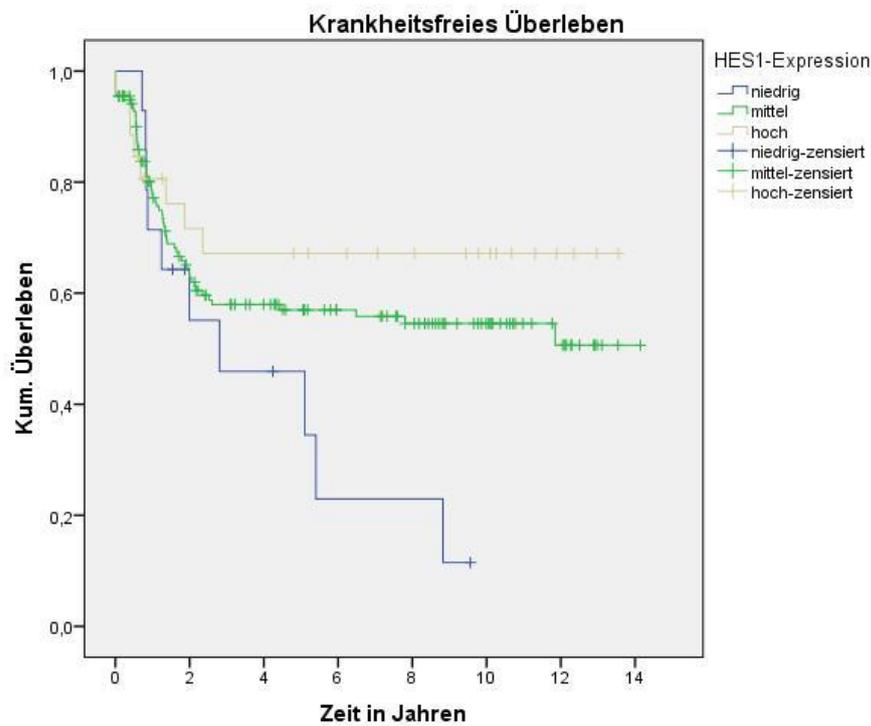


Abbildung 11: krankheitsfreies Überleben in Bezug auf die HES1-Expression

Der signifikante Unterschied in Bezug auf die NOTCH1 und HEY1-Expression bestätigte sich in der Cox-Regression. Analog zu oben zeigt Tabelle 25 die in

der Cox-Regression untersuchten signifikanten Faktoren mit Hazard ratio und p-Wert.

| Faktor | p-Wert | HR | 95% CI |
|---|---------------|-----------|---------------|
| N-Klassifikation | <0,001 | 2,53 | (1,51-4,24) |
| M- Klassifikation | 0,007 | 2,34 | (1,27-4,30) |
| p16 positiv gegen negativ | 0,002 | 0,39 | (0,21-0,72) |
| HEY1-Expression hoch gegen niedrig | 0,022 | 0,32 | (0,12-0,85) |
| NOTCH1-Expression hoch gegen mittel+niedrig | 0,043 | 0,33 | (0,12-0,97) |

Tabelle 25: Hazard ratio (HR), 95% Konfidenzintervall (CI) und p-Werte für die in der Cox-Regression untersuchten Faktoren bzgl. des krankheitsfreien Überlebens

4.4.6 NOTCH-Signalweg, p16-Status und Überleben

Anschließend wurde der Expressionsstatus des NOTCH-Signalweges in Anbetracht des p16-Status untersucht.

Der Median der NOTCH1-Expression war dabei in p16-positiven Karzinomen signifikant höher (Median 0,91) als in p16-negativen Tumoren (Median 0,61, $p < 0,001$). Es zeigte sich außerdem eine signifikante Korrelation zwischen dem NOTCH1-Expressionsstatus und der p16-Färbung (Korrelationskoeffizient 0,280, $p = 0,01$).

Bei p16-negativen Tumoren zeigte sich bei der Betrachtung des NOTCH1-Expressionsstatus hinsichtlich des OS und DFS kein Unterschied in der Überlebenszeit, während sich das zuvor beobachtete bessere Überleben bei hoher NOTCH1-Expression bei den p16-positiven Patienten fand (OS: $p = 0,139$; DFS: $p = 0,217$).

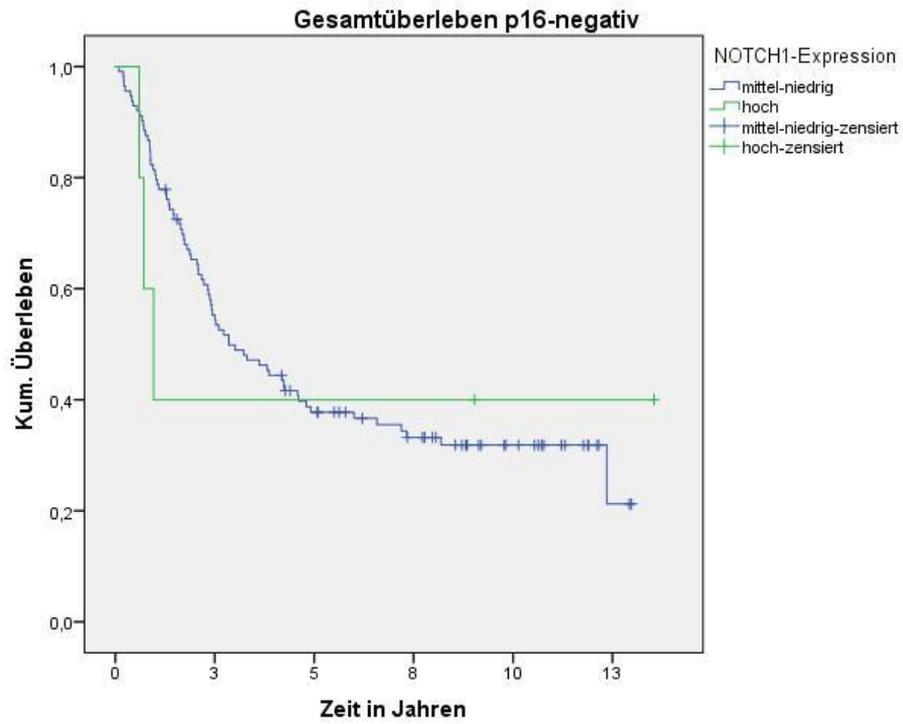


Abbildung 12: Gesamtüberleben der p16-negativen Patienten in Bezug auf die NOTCH1-Expression

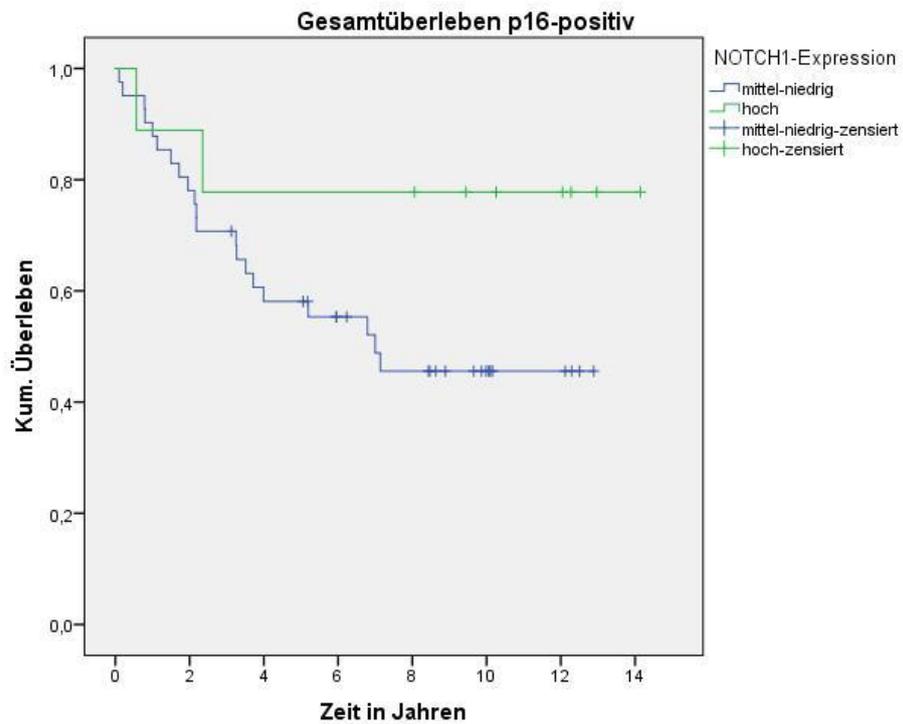


Abbildung 13: Gesamtüberleben der p16-positiven Patienten in Bezug auf die NOTCH1-Expression

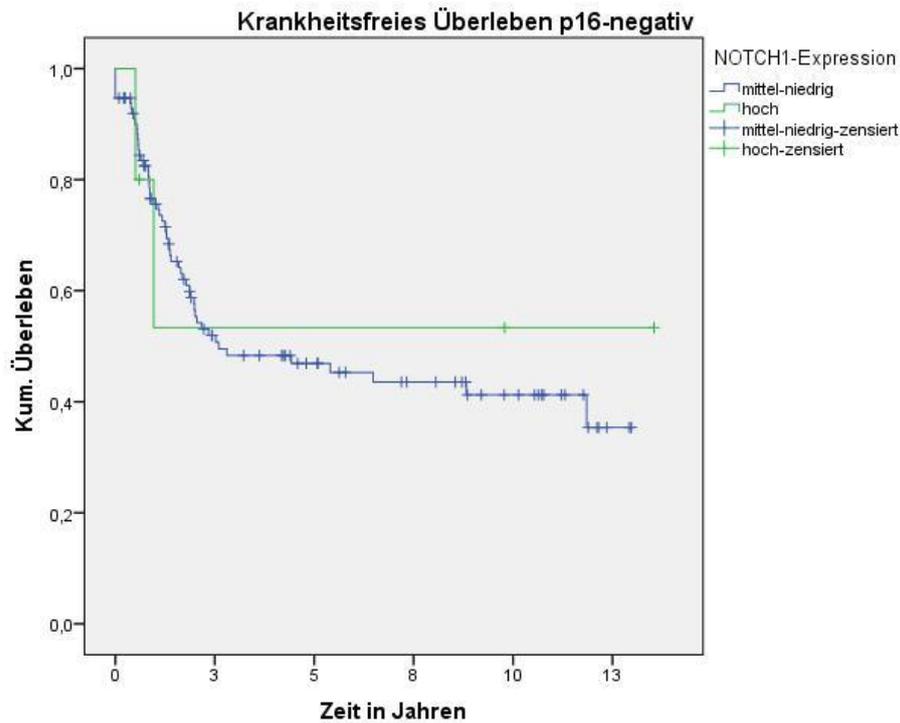


Abbildung 14: krankheitsfreies Überleben der p16-negativen Patienten in Bezug auf die NOTCH1-Expression

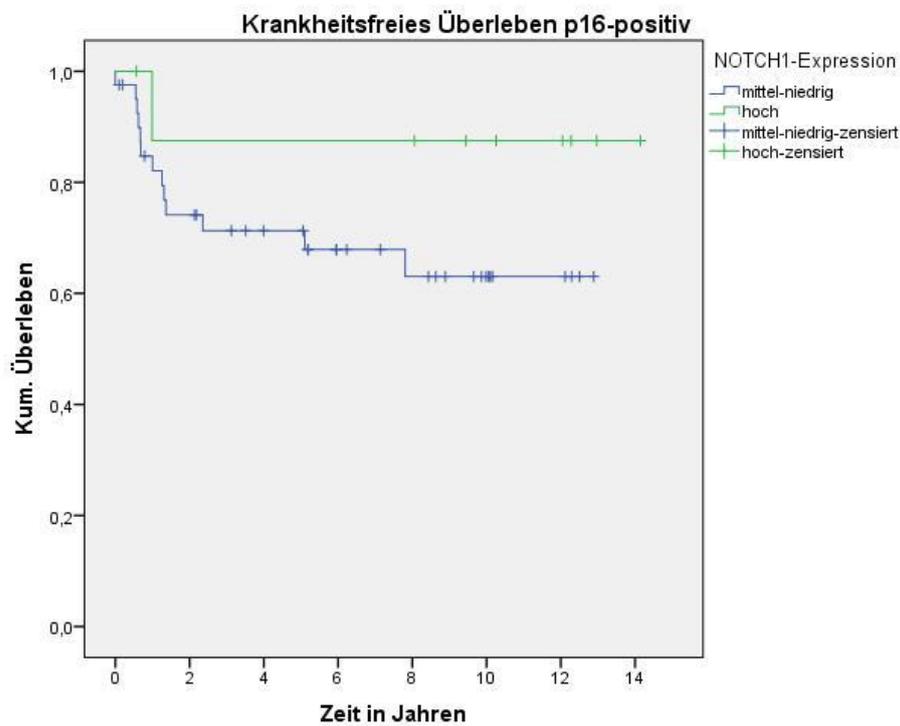


Abbildung 15: krankheitsfreies Überleben der p16-positiven Patienten in Bezug auf die NOTCH1-Expression

Die HEY1-Expression hingegen war in beiden Gruppen in oben beschriebener Weise mit dem krankheitsfreien Überleben assoziiert (p16-negativ: $p=0,069$; p16-positiv: $p=0,390$). Ein signifikanter Unterschied zeigt sich dabei bei den

p16-negativen Tumoren – eine niedrige HEY1-Expression war hierbei wiederum mit einem schlechteren DFS assoziiert als eine mittlere und hohe Expression (p=0,029).

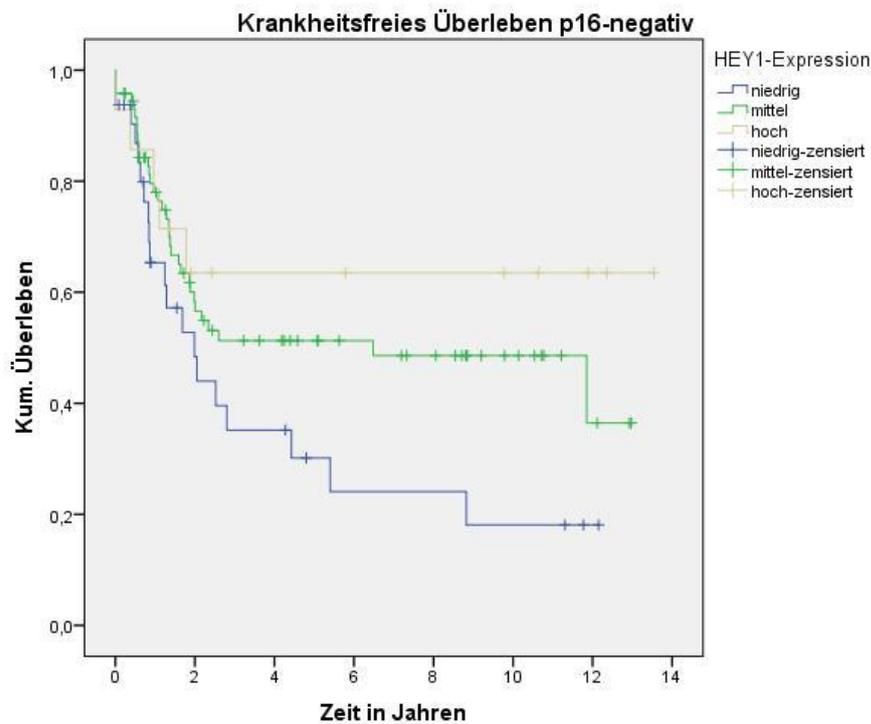


Abbildung 16: krankheitsfreies Überleben der p16-negativen Patienten in Bezug auf die HEY1-Expression

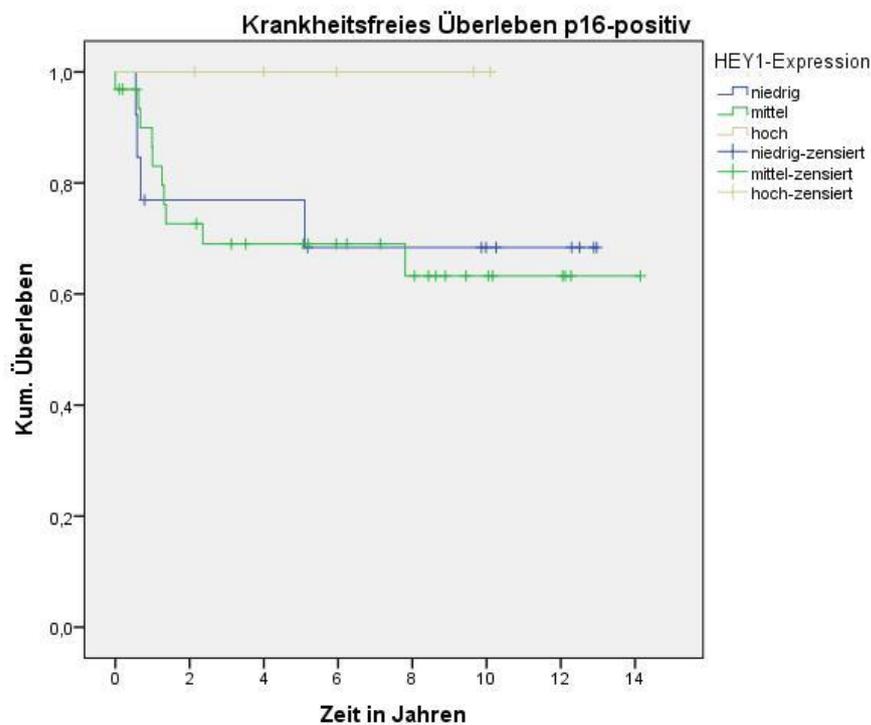


Abbildung 17: krankheitsfreies Überleben der p16-positiven Patienten in Bezug auf die HEY1-Expression

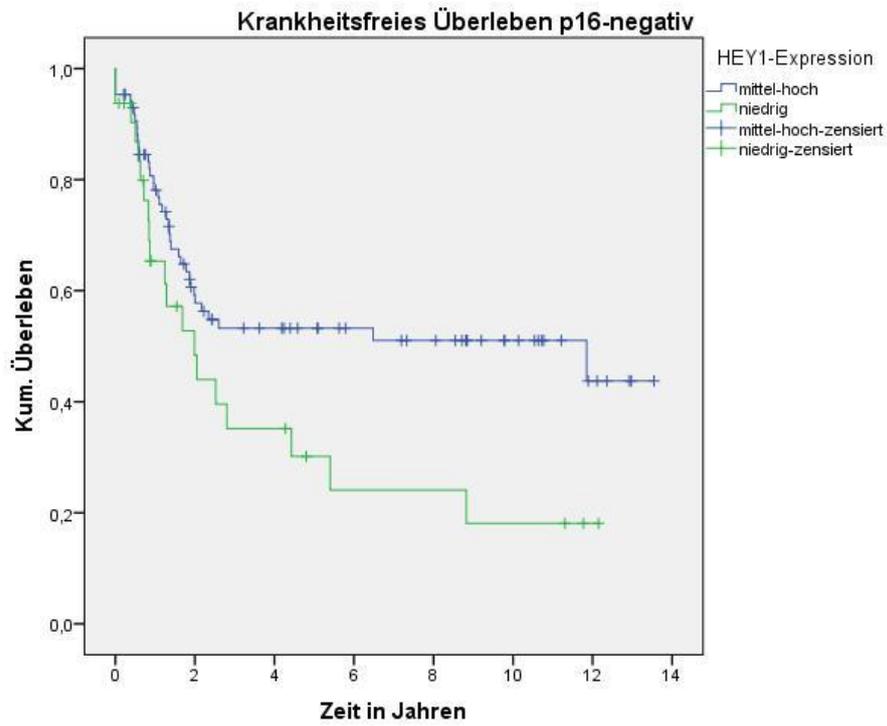


Abbildung 18: krankheitsfreies Überleben der p16-negativen Patienten in Bezug auf die HEY1-Expression (zwei Gruppen)

5 Diskussion

Im Folgenden werden die in der Arbeit gewonnenen Ergebnisse zusammengefasst und kritisch betrachtet werden.

5.1 Erniedrigte Expression des NOTCH-Signalweges bei HNSCC

Wie eingangs beschrieben, erfolgt die Aktivierung des NOTCH-Rezeptors über einen zellgebundenen Liganden. Nach Aktivierung des Rezeptors kommt es zur proteolytischen Abspaltung der intrazellulären NOTCH-Domäne, welche anschließend im Zellkern die Expression von Downstream-Effektor Genen stimuliert. In einigen Tumorentitäten zeigte sich eine Überexpression des NOTCH-Signalweges, welche die Entstehung und das Fortschreiten der Erkrankung begünstigte, der NOTCH-Signalweg also als Onkogen fungiert. In anderen Entitäten wurde jedoch eine tumorsuppressive Funktion des NOTCH-Signalweges beobachtet, bei der eine hohe NOTCH-Expression mit einer günstigeren Prognose einhergeht.

Um die grundlegenden Mechanismen des NOTCH-Signalweges in Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs zu verstehen, wurde zunächst die mRNA Expression des NOTCH-Signalweges in Tumorgewebe und Normalgewebe verglichen.

In der hier untersuchten Kohorte fand sich eine signifikant niedrigere Expression von NOTCH1, NOTCH3, sowie des Downstream-Effektors HES1. Weiterhin wurden der Ligand JAG1 und der Downstream-Effektor HEY1 untersucht, hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Eine andere Studie, welche das Expressionslevel des NOTCH-Signalwegs untersuchte, zeigte hingegen eine verstärkte Expression von JAG1, JAG2, NOTCH3, HES1 und HEY1 in HNSCC verglichen mit Normalgewebe (Sun et al., 2014). In dieser Studie wurde allerdings nur Gewebe von 44 Tumorpatienten betrachtet, während in dieser Arbeit 195 Tumorgewebeproben untersucht wurden. Zusätzlich erfolgte in dieser Arbeit der Vergleich mit normaler Schleimhaut aus Larynx, Mundhöhle und Oro- sowie Hypopharynx, welche im Verhältnis in etwa die Verteilung des Tumorgewebes widerspiegelte, während in o.g. Studie lediglich Vergleichsgewebe aus Uvulopalatopharyngoplastiken betrachtet

wurde.

Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten also in der unterschiedlichen jeweiligen Kohortengröße und dem unterschiedlichen Normalgewebe begründet sein.

Grundsätzlich erscheint eine erniedrigte Expression des NOTCH-Signalweges in Tumorgewebe auch vor dem Hintergrund einleuchtend, dass in Tumorgewebe eine erhöhte Zahl an inaktivierenden NOTCH-Mutationen beschrieben wurde (Stransky et al., 2011).

5.2 Hohe Expression des NOTCH-Signalweges geht mit besserem Überleben einher

In der Arbeit wurde weiterhin der Zusammenhang zwischen dem Krankheitsverlauf der untersuchten Patienten und der mRNA-Expression in den Tumoren untersucht. Hierzu wurden nach oben beschriebener Methode die Patienten in eine Gruppe mit hoher und niedriger Expression eingeteilt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Gruppe mit einer hohen NOTCH1-Expression ein signifikant besseres Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben hatte. Analog dazu zeigten Patienten mit einer geringen Expression des Downstream-Effektors HEY1 ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben, wohingegen eine hohe Expression von HEY1 mit einem besseren Überleben einherging.

Vor dieser Arbeit war die Rolle der Expression des NOTCH-Signalweges bei Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs nur an kleineren Kollektiven untersucht worden. Eine Analyse der Untergruppe der Oropharynxkarzinome einer anderen Arbeitsgruppe zeigte beispielsweise, dass die immunhistochemische Anfärbung von NOTCH1 mit einem verbesserten Überleben korrelierte (Kaka et al., 2017). Analog dazu wurde in einer anderen Studie eine niedrigere Differenzierung von Karzinomen bei negativer immunhistochemischer Färbung der intrazellulären NOTCH1-Domäne beschrieben (Rettig et al., 2015).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigten andere Studien allerdings eine schlechte Prognose bei Patienten mit einer hohen NOTCH1-Expression (Lee et al., 2016; Lin et al., 2010).

Es stellt sich also die Frage, wie sich die unterschiedlichen Ergebnisse

begründen lassen. In der Mutationsanalyse von Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs zeigen sich bei westlichen Kollektiven Mutationsraten bei NOTCH1 von etwa 11 bis 15 Prozent, wie oben bereits angesprochen handelt es sich hierbei vor allem um inaktivierende Mutationen (Agrawal et al., 2011; Stransky et al., 2011).

In einer chinesischen Studie wurden hingegen NOTCH1-Mutationen in 43% der untersuchten Patienten gefunden, im Unterschied zu den westlichen Arbeiten zeigten sich hier auch zu einem relevanten Anteil aktivierende Mutationen (Song et al., 2014).

Diese Unterschiede in der Mutationsfrequenz, aber auch in der Art der Mutationen und die bimodale Rolle des NOTCH-Signalweges bei Tumorerkrankungen, könnten die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. So wäre es beispielsweise denkbar, dass es aufgrund der Mutationen und der damit veränderten Proteinstruktur zu einer verringerten Anfärbung in der Immunhistochemie kommt, oder aber, dass es durch einen verringerten Abbau des Genproduktes zu einem falsch-hohen Nachweis kommt.

Als weiterer Faktor konnte gezeigt werden, dass Mutationen im Bereich des NOTCH-Rezeptors die Aktivierung der nachgeschalteten Effektoren beeinflussen. So zeigten Patienten mit einem Wildtyp NOTCH1-Rezeptor eine Überexpression von HES1 und HEY1 im Tumorgewebe, während bei Patienten mit einem mutierten NOTCH1-Rezeptor die nachgeschalteten Effektoren nicht erhöht waren (Sun et al., 2014).

5.3 p16-positive Karzinome mit hoher NOTCH-Expression zeigen eine gute Prognose

Wie eingangs beschrieben, lässt sich in den letzten Jahren eine zunehmende Zahl von Plattenepithelkarzinomen im Hals-Kopf-Bereich beobachten, welche eine Assoziation zur Infektion mit humanen Papillomaviren zeigen. Diese Patienten sind im Schnitt jünger als Patienten mit den „klassischen“ Risikofaktoren Alkohol- und Nikotinabusus und weisen eine bessere Prognose auf. Gerade in Hinblick auf eine mögliche Therapiedeeskalation werden hier dringend weitere Marker benötigt, um eine exaktere Risikostratifizierung treffen zu können.

In der Arbeit konnte eine signifikante Korrelation zwischen p16-Status und

NOTCH1-Expression gezeigt werden. Es zeigte sich dabei eine signifikant höhere NOTCH1-Expression in p16-positiven Tumoren. In der Überlebenszeitanalyse mittels Regressionsanalyse waren sowohl NOTCH1-Expression als auch p16-Status signifikante, unabhängige Faktoren für das Gesamtüberleben.

Patienten mit p16-positiven Karzinomen zeigten weiterhin ein signifikant besseres Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben als Patienten mit p16-negativen Karzinomen. Innerhalb der Gruppe der p16-positiven Karzinome zeigten Patienten mit einer hohen NOTCH1-Expression ein nochmals besseres Überleben als Patienten mit einer mittleren oder niedrigen Expression ($p=0,139$).

Damit übereinstimmend wurde in der immunhistochemischen Analyse von Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs gezeigt, dass Tumoren mit negativer Färbung der intrazellulären NOTCH1-Domäne weniger wahrscheinlich HPV-positiv waren, als Tumore mit einer positiven Färbung (Rettig et al., 2015). Eine andere Studie hingegen zeigte in einem kleineren Kollektiv keinen Zusammenhang zwischen HPV-Status und immunhistochemischer NOTCH1-Färbung (Troy et al., 2013). Die abweichenden Ergebnisse könnten möglicherweise an der kleinen Kohortengröße oder den oben angesprochenen Limitationen der Immunhistochemie in Anbetracht des Mutationsstatus begründet sein. In diesem Kontext sollte noch ergänzt werden, dass in HPV-positiven Karzinomen deutlich seltener inaktivierende Mutationen gefunden wurden, als in HPV-negativen Karzinomen (Agrawal et al., 2011; Stransky et al., 2011). Es ist also davon auszugehen, dass der NOTCH-Signalweg unterschiedliche Bedeutungen in den beiden Untergruppen besitzt. So wurde gezeigt, dass das E6-Protein des Papillomavirus über Interaktion mit MAML1 (Mastermind Like Transcriptional Coactivator 1) den NOTCH-Signalweg über die nachgeschaltete Signaltransduktionskette und damit Zelldifferenzierung inhibiert (Brimer, Lyons, Wallberg, & Vande Pol, 2012). Eine solche Inhibierung der nachgeschalteten Signaltransduktion und Effektoren könnte also auch in Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs die erhöhte NOTCH1-Expression in p16-positiven Karzinomen erklären.

Wie oben beschrieben konnte in dieser Arbeit die immunhistochemische

Analyse von p16 nur an 168 von den insgesamt 195 Tumorgewebeproben durchgeführt werden. Die Untergruppe der p16-positiven Karzinome war daher wohl zu klein, um einen signifikanten Unterschied in der Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der NOTCH1-Expression zu zeigen. Aktuelle Empfehlungen zur Auswertung der p16-Immunhistochemie des College of American Pathologists empfehlen einen Grenzwert von 70% positiven Zelle, um von einem HPV positiven Tumor auszugehen. Es wird jedoch auch darauf hingewiesen, dass in verschiedenen Populationen möglicherweise verschiedene Grenzwerte besser zutreffen könnten (Lewis et al., 2018). Zusätzlich geht in den in dieser Arbeit verwendeten Score nicht nur die Prozentzahl der gefärbten Zellen ein, sondern auch die Intensität der Färbung ein, sodass falsch positive Werte vermieden werden. Da aber zum Zeitpunkt dieser Analyse eine solche Empfehlung noch nicht verfügbar war, könnten sich im Vergleich zu einer aktuellen Auswertung Unterschiede ergeben.

In der vorliegenden Analyse wurden Karzinome aus sämtlichen untersuchten Lokalisationen auf eine Assoziation zu p16 untersucht. Insgesamt wurden 50 Fälle als p16-positiv eingestuft, was 29,76 % der gefärbten Fälle entspricht. Die Mehrheit der positiven Karzinome fand sich im Bereich des Oropharynx (36 Fälle), es fanden sich jedoch auch positive Karzinome in den übrigen Lokalisationen. Gemäß aktuellen Empfehlungen sollte in der klinischen Routine allerdings keine standardmäßige Färbung von p16 in Tumoren außerhalb des Oropharynx erfolgen (Lewis et al., 2018). Die Rolle von p16 beziehungsweise HPV in Tumoren außerhalb des Oropharynx ist nach wie vor nicht abschließend geklärt. Weitere Studien, die sich mit dem Einfluss von NOTCH1 und HPV beschäftigen, sollten sich daher zunächst auf den Oropharynx konzentrieren, um Verfälschungen durch falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Dennoch zeigt sich hier ein klarer Trend, dass mit der Subgruppe der p16-positiven Patienten mit hoher NOTCH1-Expression eine Untergruppe identifiziert werden konnte, welche mit einer guten Prognose einhergehen.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Klassifizierung von HPV-assoziierten Karzinomen nach dem p16-Status folgt der aktuellen TNM-Klassifikation (C. Wittekind, 2017). Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass nicht nur Diskrepanzen zwischen dem immunhistochemischen p16-Nachweis und dem Nachweis von HPV-DNA beispielweise über PCR bestehen, sondern, dass sich zwischen den

jeweiligen Untergruppen auch prognostische Unterschiede zeigen (Albers, Qian, Kaufmann, & Coordes, 2017). Es sollten also weitere Studien zu diesen verschiedenen Untergruppen durchgeführt werden, um eine Fehlklassifikation und damit mögliche negative Konsequenzen in der Therapieplanung zu vermeiden.

Da Patienten mit HPV-positiven Karzinomen wie oben erwähnt allgemein in jüngerem Alter erkranken und eine bessere Prognose besitzen, kommen insbesondere hier Spät- und Langzeitfolgen der Tumorthherapie zu tragen. Es sollte also zunächst die Bestätigung dieser Ergebnisse an einem ausreichend großen Kollektiv von p16-positiven Patienten erfolgen, um im Anschluss die Eignung der NOTCH1-Expression als prognostischen Marker weiter verfolgen zu können, um in Zukunft zum Beispiel eine bessere Auswahl der Therapiemodalitäten oder eine mögliche Therapie-Deeskalation bei den einzelnen Gruppen erreichen zu können.

5.4 Ausblick

Mit der aktuellen Ausgabe der TNM-Klassifikation wurde mit der Berücksichtigung des p16-Status erst vor kurzem erstmals ein molekularer Marker in der Bewertung von Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs etabliert (C. Wittekind, 2017). Bisher sind allerdings keine weiteren molekularen Marker verfügbar, um das Risiko und den Krankheitsverlauf von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren besser vorhersagen zu können. In anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Mammakarzinom, werden hingegen seit längerem eine Vielzahl von molekularen Faktoren berücksichtigt, um Subtypen der Erkrankung identifizieren zu können. In diesem Beispiel stehen so unter anderem der Östrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus, wie auch die Ausprägung von ki-67 und HER2 (Proto-Oncogene C-ErbB-2) sowohl zur Risikostratifizierung als auch als mögliche therapeutische Ziele zur Verfügung (Goldhirsch et al., 2013).

Da die Therapie bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs mit teils großen funktionellen und ästhetischen Einschränkungen einhergeht, und andererseits eine erhebliche Rezidivgefahr zu verzeichnen ist, erscheint hier eine bessere Risikostratifizierung und dadurch eine personalisierte Therapie besonders essentiell, um einerseits Übertherapie und damit einhergehende schwerwiegende Nebenwirkungen zu vermeiden und andererseits die

Rezidivrate der Patienten durch adäquate Therapie soweit wie möglich zu senken. Zusätzlich dazu können bei der Suche nach solchen Faktoren auch therapeutische Ziele für zielgerichtete Therapieansätze identifiziert werden.

Auf Basis der in der Arbeit gewonnenen Ergebnisse erscheint der NOTCH-Signalweg in Verbindung mit weiteren Faktoren, wie beispielsweise dem p16-Status, als vielversprechender molekularer Marker zur Risikostratifizierung von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs. Neben dem in dieser Arbeit untersuchten Expressionsstatus des Signalwegs, sollten auch Mutationen des Signalweges und deren Auswirkungen weiter beleuchtet werden. Wie oben erläutert, ist auf Basis der gewonnenen Ergebnisse von einer Tumorsuppressorfunktion des NOTCH-Signalweges in HNSCC auszugehen. Beachtet man aber die oben genannten Ergebnisse anderer Arbeiten, scheinen auch Untergruppen zu existieren, in denen NOTCH in Anbetracht seiner aus anderen Tumorentitäten bekannten dualen Rolle als Onkogen fungiert, sodass je nach Untergruppe der NOTCH-Signalweg auch als möglicher Ansatzpunkt für zielgerichtete Therapien denkbar ist.

Weitere Untersuchungen sowohl des NOTCH-Signalweges als auch anderer molekularer Marker sind daher essentiell, um das Überleben und die Lebensqualität von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs in Zukunft weiter verbessern zu können.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit ist die zum aktuellen Zeitpunkt größte Analyse des NOTCH-Signalweges und dem Krankheitsverlauf von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereichs.

Es wurde eine signifikant niedrigere Expression von Schlüsselkomponenten des NOTCH-Signalweges in Karzinomen verglichen mit normalem Gewebe gezeigt. Weiterhin konnte die NOTCH1-Expression als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben der Patienten gezeigt werden. Eine hohe Expression von NOTCH1 war dabei mit einem signifikant verlängerten Überleben assoziiert. Die Ergebnisse wurden durch die analogen Ergebnisse des nachgeschalteten Effektors HEY1 in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben unterstützt. Im Rahmen der bimodalen Rolle des NOTCH-Signalweges in Tumorerkrankungen kann auf Basis der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse von einer Tumorsuppressorfunktion des NOTCH-Signalweges in dem untersuchten Kollektiv angenommen werden.

Es wurde weiterhin gezeigt, dass in p16-positiven Karzinomen die NOTCH1-Expression signifikant höher ist als in p16-negativen Karzinomen.

Die Untergruppe der p16-positiven Patienten mit hoher NOTCH1-Expression zeigte dabei einen deutlichen Trend für verlängertes Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben, sodass nach Bestätigung der Ergebnisse an einem geeigneten Kollektiv weitere Studien zur prognostischen Bedeutung des NOTCH-Signalweges möglich sind.

Auf Basis der gewonnenen Ergebnisse erscheint der NOTCH-Signalweg als vielversprechender molekularer Marker zur Risikostratifizierung und möglicherweise der Therapieplanung von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|--|
| °C | Grad Celsius |
| Abb. | Abbildung |
| bp | Basenpaare |
| bzgl. | bezüglich |
| bzw. | Beziehungsweise |
| ca. | circa |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary deoxyribonucleic acid) |
| CT | Computertomographie |
| DFS | disease-free survival |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid) |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| FFPE | Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (formalin-fixed, paraffin-embedded) |
| g | Gramm |
| ggf | gegebenenfalls |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HER2 | Proto-Oncogene C-ErbB-2 |
| HES1 | (Hes Family BHLH Transcription Factor 1) |
| HEY1 | (Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 1) |
| HNSCC | Plattenepithelkarzinom des Hals-Kopf-Bereichs (head and neck squamous cell carcinoma) |
| HPV | Humanes Papillomavirus |
| JAG1 | Jagged1 |
| l | Liter |
| MAML1 | Mastermind Like Transcriptional Coactivator 1 |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| OS | overall survival |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PD-1 | Programmed cell death protein 1 |

| | |
|---------|--|
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| Rb | Retinoblastom-Protein |
| qRT-PCR | quantitative Echtzeit-PCR (real-time quantitative PCR) |
| RNA | Ribonukleinsäure (ribonucleic acid) |
| rpm | rounds per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| Tbl. | Tabelle |
| UICC | internationalen Vereinigung gegen Krebs (Union internationale contre le cancer) |
| V | Volt |
| z. B. | zum Beispiel |

8 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Modell der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren, modifiziert nach Califano (Califano et al., 1996)..... | 12 |
| Abbildung 2: p16-positives (links) bzw. negatives (rechts) Plattenepithelkarzinom..... | 31 |
| Abbildung 3: Gesamtüberleben des Tumorkollektivs..... | 33 |
| Abbildung 4: krankheitsfreies Überleben des Tumorkollektivs | 34 |
| Abbildung 5: Gesamtüberleben in Bezug auf den p16-Status | 34 |
| Abbildung 6: krankheitsfreies Überleben in Bezug auf den p16-Status..... | 35 |
| Abbildung 7: Gesamtüberleben in Bezug auf die NOTCH1-Expression..... | 36 |
| Abbildung 8: krankheitsfreies Überleben in Bezug auf die NOTCH1-Expression | 38 |
| Abbildung 9: krankheitsfreies Überleben in Bezug auf die HEY1-Expression (zwei Gruppen) .. | 39 |
| Abbildung 10: krankheitsfreies Überleben in Bezug auf die HEY1-Expression (3 Gruppen) | 40 |
| Abbildung 11: krankheitsfreies Überleben in Bezug auf die HES1-Expression..... | 40 |
| Abbildung 12: Gesamtüberleben der p16-negativen Patienten in Bezug auf die NOTCH1-Expression..... | 42 |
| Abbildung 13: Gesamtüberleben der p16-positiven Patienten in Bezug auf die NOTCH1-Expression..... | 42 |
| Abbildung 14: krankheitsfreies Überleben der p16-negativen Patienten in Bezug auf die NOTCH1-Expression..... | 43 |
| Abbildung 15: krankheitsfreies Überleben der p16-positiven Patienten in Bezug auf die NOTCH1-Expression..... | 43 |
| Abbildung 16: krankheitsfreies Überleben der p16-negativen Patienten in Bezug auf die HEY1-Expression..... | 44 |
| Abbildung 17: krankheitsfreies Überleben der p16-positiven Patienten in Bezug auf die HEY1-Expression..... | 44 |
| Abbildung 18: krankheitsfreies Überleben der p16-negativen Patienten in Bezug auf die HEY1-Expression (zwei Gruppen) | 45 |

9 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| <i>Tabelle 1: pathologische Klassifikation des Primärtumors (nach Wittekind, 2003)</i> | 7 |
| <i>Tabelle 2: pathologische Klassifikation der regionären Lymphknoten (nach Wittekind, 2003)</i> | 8 |
| <i>Tabelle 3: pathologische Klassifikation der Fernmetastasen (nach Wittekind, 2003)</i> | 8 |
| <i>Tabelle 4: Histopathologisches Grading (nach Wittekind, 2003)</i> | 9 |
| <i>Tabelle 5: Klassifikation des Residualtumors (nach Wittekind, 2003)</i> | 9 |
| <i>Tabelle 6: Verwendete Kits</i> | 16 |
| <i>Tabelle 7: Verwendete Reagenzien</i> | 17 |
| <i>Tabelle 8: Gemischte Reagenzien und Puffer</i> | 17 |
| <i>Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien</i> | 18 |
| <i>Tabelle 10: Verwendete Geräte</i> | 19 |
| <i>Tabelle 11: Computersoftware</i> | 20 |
| <i>Tabelle 12: cDNA Mastermix 1</i> | 22 |
| <i>Tabelle 13: cDNA Mastermix 2</i> | 22 |
| <i>Tabelle 14: Verwendete Primer</i> | 24 |
| <i>Tabelle 15: Mastermix real-time PCR</i> | 26 |
| <i>Tabelle 16: Programm real-time PCR</i> | 26 |
| <i>Tabelle 17: Punkteverteilung für Histoscore</i> | 27 |
| <i>Tabelle 18: Charakterisierung HNSCC-Patienten</i> | 29 |
| <i>Tabelle 19: Charakterisierung der tumorfreien Patienten</i> | 30 |
| <i>Tabelle 20: Auswertung der p16-Immunhistochemie</i> | 30 |
| <i>Tabelle 21: $\Delta\Delta CT$-Werte von Normal- und Tumorgewebe</i> | 32 |
| <i>Tabelle 22: Kaplan-Meier-Analyse mit Log-rank Test des Gesamtüberlebens</i> | 36 |
| <i>Tabelle 23: Hazard ratio, 95% Konfidenzintervall und p-Werte für die in der Cox-Regression untersuchten Faktoren bzgl. des Gesamtüberlebens</i> | 37 |
| <i>Tabelle 24: Kaplan-Meier-Analyse mit Log-rank Test des krankheitsfreien Überlebens</i> | 37 |
| <i>Tabelle 25: Hazard ratio (HR), 95% Konfidenzintervall (CI) und p-Werte für die in der Cox-Regression untersuchten Faktoren bzgl. des krankheitsfreien Überlebens</i> | 41 |

10 Literatur

- Agrawal, N., Frederick, M. J., Pickering, C. R., Bettegowda, C., Chang, K., Li, R. J., . . . Myers, J. N. (2011). Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*, *333*(6046), 1154-1157. doi:10.1126/science.1206923
- Albers, A. E., Qian, X., Kaufmann, A. M., & Coordes, A. (2017). Meta analysis: HPV and p16 pattern determines survival in patients with HNSCC and identifies potential new biologic subtype. *Sci Rep*, *7*(1), 16715. doi:10.1038/s41598-017-16918-w
- Brierley, J., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. U. f. I. C. C. (2017). *TNM classification of malignant tumours*. Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell.
- Brimer, N., Lyons, C., Wallberg, A. E., & Vande Pol, S. B. (2012). Cutaneous papillomavirus E6 oncoproteins associate with MAML1 to repress transactivation and NOTCH signaling. *Oncogene*, *31*(43), 4639-4646. doi:10.1038/onc.2011.589
- Böcker, W. (Ed.) (2012). *Pathologie : mit rund 150 Tabellen; [Plus im Web mediscript]* (5., vollst. überarb. Aufl. ed.). München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., . . . Sidransky, D. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*, *56*(11), 2488-2492.
- Campo-Trapero, J., Cano-Sanchez, J., Palacios-Sanchez, B., Sanchez-Gutierrez, J. J., Gonzalez-Moles, M. A., & Bascones-Martinez, A. (2008). Update on molecular pathology in oral cancer and precancer. *Anticancer Res*, *28*(2B), 1197-1205.
- Dietrich, D., Uhl, B., Sailer, V., Holmes, E. E., Jung, M., Meller, S., & Kristiansen, G. (2013). Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One*, *8*(10), e77771. doi:10.1371/journal.pone.0077771
- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D., & Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, *66*(4), 649-661.
- Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thurlimann, B., . . . Panel, m. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*, *24*(9), 2206-2223. doi:10.1093/annonc/mdt303
- Hernandez, B. Y., Zhu, X., Goodman, M. T., Gatewood, R., Mendiola, P., Quinata, K., & Paulino, Y. C. (2017). Betel nut chewing, oral premalignant lesions, and the oral microbiome. *PLoS One*, *12*(2), e0172196. doi:10.1371/journal.pone.0172196
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, *10*(4), 413-417.
- Humans, I. W. G. o. t. E. o. C. R. t. (2007). Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, *90*, 1-636.
- Hunter, K. D., Parkinson, E. K., & Harrison, P. R. (2005). Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, *5*(2), 127-135. doi:10.1038/nrc1549
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, *60*(5), 277-300. doi:10.3322/caac.20073
- Kaatsch, P., Spix, C., Hentschel, S., Katalinic, A., Luttmann, S., & Stegmaier, C. (2017). *Krebs in Deutschland für 2013/2014 - 11. Ausgabe, 2017*. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf?blob=publicationFileAufgrerufen am 15.12.2017, 10:32

- Kaka, A. S., Nowacki, N. B., Kumar, B., Zhao, S., Old, M. O., Agrawal, A., . . . Teknos, T. N. (2017). Notch1 Overexpression Correlates to Improved Survival in Cancer of the Oropharynx. *Otolaryngol Head Neck Surg*, *156*(4), 652-659. doi:10.1177/0194599816688178
- Kimmeyer, J., Kurzweg, T., Hoffmann, T. K., Knecht, R., Veit, J. A., Mockelmann, N., . . . Laban, S. (2016). Oncologic treatment landscape for head and neck squamous cell carcinoma : Treatment infrastructure in German-speaking countries. *HNO*, *64*(7), 494-500. doi:10.1007/s00106-016-0188-9
- Kundu, S. K., & Nestor, M. (2012). Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumour Biol*, *33*(3), 707-721. doi:10.1007/s13277-012-0350-2
- Kwon, M. J., Oh, E., Lee, S., Roh, M. R., Kim, S. E., Lee, Y., . . . Shin, Y. K. (2009). Identification of novel reference genes using multiplatform expression data and their validation for quantitative gene expression analysis. *PLoS One*, *4*(7), e6162. doi:10.1371/journal.pone.0006162
- Lee, S. H., Do, S. I., Lee, H. J., Kang, H. J., Koo, B. S., & Lim, Y. C. (2016). Notch1 signaling contributes to stemness in head and neck squamous cell carcinoma. *Lab Invest*, *96*(5), 508-516. doi:10.1038/labinvest.2015.163
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, *11*(1), 9-22. doi:10.1038/nrc2982
- Lehnerdt, G., Hoffmann, T. K., Mattheis, S., Brandau, S., Zeidler, R., & Lang, S. (2010). Tumormarker und Prognosefaktoren bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region. *HNO*, *58*(7), 713-725. doi:10.1007/s00106-010-2108-8
- Lewis, J. S., Jr., Beadle, B., Bishop, J. A., Chernock, R. D., Colasacco, C., Lacchetti, C., . . . Faquin, W. C. (2018). Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*, *142*(5), 559-597. doi:10.5858/arpa.2017-0286-CP
- Lin, J. T., Chen, M. K., Yeh, K. T., Chang, C. S., Chang, T. H., Lin, C. Y., . . . Chang, P. J. (2010). Association of high levels of Jagged-1 and Notch-1 expression with poor prognosis in head and neck cancer. *Ann Surg Oncol*, *17*(11), 2976-2983. doi:10.1245/s10434-010-1118-9
- Lindel, K., Beer, K. T., Laissue, J., Greiner, R. H., & Aebersold, D. M. (2001). Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer*, *92*(4), 805-813.
- Lobry, C., Oh, P., & Aifantis, I. (2011). Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J Exp Med*, *208*(10), 1931-1935. doi:10.1084/jem.20111855
- Man, C. H., Wei-Man Lun, S., Wai-Ying Hui, J., To, K. F., Choy, K. W., Wing-Hung Chan, A., . . . Lo, K. W. (2012). Inhibition of NOTCH3 signalling significantly enhances sensitivity to cisplatin in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol*, *226*(3), 471-481. doi:10.1002/path.2997
- Mast, G. (2014). *Kopf-Hals-Malignome*. München [i.e.] Germering: Zuckschwerdt.
- Moreira, J., Tobias, A., O'Brien, M. P., & Agulnik, M. (2017). Targeted Therapy in Head and Neck Cancer: An Update on Current Clinical Developments in Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy and Immunotherapies. *Drugs*, *77*(8), 843-857. doi:10.1007/s40265-017-0734-0
- Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J., & Aifantis, I. (2014). From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer Cell*, *25*(3), 318-334. doi:10.1016/j.ccr.2014.02.018
- Pickhard, A., Grober, S., Haug, A. K., Piontek, G., Wirth, M., Strassen, U., . . . Reiter, R. (2014). Survivin and pAkt as potential prognostic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, *117*(6), 733-742. doi:10.1016/j.oooo.2014.02.005

- Ragin, C. C., Modugno, F., & Gollin, S. M. (2007). The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res*, *86*(2), 104-114. doi:10.1177/154405910708600202
- Rettig, E. M., Chung, C. H., Bishop, J. A., Howard, J. D., Sharma, R., Li, R. J., . . . Fakhry, C. (2015). Cleaved NOTCH1 Expression Pattern in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Associated with NOTCH1 Mutation, HPV Status, and High-Risk Features. *Cancer Prev Res (Phila)*, *8*(4), 287-295. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0366
- Ritchie, J. M., Smith, E. M., Summersgill, K. F., Hoffman, H. T., Wang, D., Klussmann, J. P., . . . Haugen, T. H. (2003). Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer*, *104*(3), 336-344. doi:10.1002/ijc.10960
- Rodriguez, T., Altieri, A., Chatenoud, L., Gallus, S., Bosetti, C., Negri, E., . . . La Vecchia, C. (2004). Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol*, *40*(2), 207-213.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, *230*(4732), 1350-1354.
- Schauer, A., Rothe, H., Balzer, I., Fiebig, I., & Rauschecker, H. (1988). [Immunohistochemical tumor diagnosis in breast cancer--use for assessing the stage and biology of so-called "small breast cancer"]. *Rontgenblatter*, *41*(8), 340-344.
- Song, X., Xia, R., Li, J., Long, Z., Ren, H., Chen, W., & Mao, L. (2014). Common and complex Notch1 mutations in Chinese oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, *20*(3), 701-710. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1050
- Stransky, N., Egloff, A. M., Tward, A. D., Kostic, A. D., Cibulskis, K., Sivachenko, A., . . . Grandis, J. R. (2011). The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*, *333*(6046), 1157-1160. doi:10.1126/science.1208130
- Sun, W., Gaykalova, D. A., Ochs, M. F., Mambo, E., Arnaoutakis, D., Liu, Y., . . . Califano, J. A. (2014). Activation of the NOTCH pathway in head and neck cancer. *Cancer Res*, *74*(4), 1091-1104. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1259
- Szabo, A., Perou, C. M., Karaca, M., Perreard, L., Palais, R., Quackenbush, J. F., & Bernard, P. S. (2004). Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biol*, *5*(8), R59. doi:10.1186/gb-2004-5-8-r59
- Troy, J. D., Weissfeld, J. L., Youk, A. O., Thomas, S., Wang, L., & Grandis, J. R. (2013). Expression of EGFR, VEGF, and NOTCH1 suggest differences in tumor angiogenesis in HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*, *7*(4), 344-355. doi:10.1007/s12105-013-0447-y
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., . . . Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, *306*(5694), 269-271. doi:10.1126/science.1102160
- With, C. M., Evers, D. L., & Mason, J. T. (2011). Regulatory and ethical issues on the utilization of FFPE tissues in research. *Methods Mol Biol*, *724*, 1-21. doi:10.1007/978-1-61779-055-3_1
- Wittekind, C. (2017). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*: Wiley VCH Verlag GmbH.
- Wittekind, C. I. U. a. C. (2003). *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. Berlin [u.a.]: Springer.

11 Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse der Arbeit wurden bereits vor der Publikation der Dissertation im Rahmen von Zeitschriftenartikeln oder Postervorträgen veröffentlicht:

Art der Vorveröffentlichung: Zeitschriftenartikel

Titel: High NOTCH1 mRNA Expression Is Associated with Better Survival in HNSCC

Autor(en): Markus Wirth, Daniel Jira, Armin Ott, Guido Piontek, Anja Pickhard

Zeitschrift: International Journal of Molecular Sciences

Volumen, Seitenzahl: 19, 830 (Artikelnummer)

Tag der Veröffentlichung: 13.03.2018

PMID: 29533972

Art der Vorveröffentlichung: Zeitschriftenartikel

Titel: HES1 mRNA expression is associated with survival in sinonasal squamous cell carcinoma.

Autor(en): Markus Wirth, Johannes Döscher, Daniel Jira, Melanie Annemarie Meier, Guido Piontek, Rudolf Reiter, Jürgen Schlegel, Anja Pickhard

Zeitschrift: Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology

Volumen, Seitenzahl: 122, 491-499

Tag der Veröffentlichung: 10.06.2016

PMID: 27567696

Art der Vorveröffentlichung: Postervortrag

Titel: HES1 als prognostischer Marker beim sinunasalen Plattenepithelkarzinom

Autor(en): Markus Wirth, Johannes Döscher, Guido Piontek, Daniel Jira, Anja Pickhard

Kongress: 86. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., 13.05. - 16.05.2015, Berlin

Tag der Veröffentlichung: 26.03.2015

doi: 10.3205/15hnod280

Art der Vorveröffentlichung: Postervortrag

Titel: NOTCH1 Expression bei HNSCC mit dem Überleben assoziiert

Autor(en): Markus Wirth, Daniel Jira, Anja Pickhard

Kongress: 88. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., 25.05. - 27.05.2017, Erfurt

Tag der Veröffentlichung: 13.04.2017

doi: 10.3205/17hno214

12 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anja Pickhard für ihre unvergleichliche und großartige Betreuung der Forschungsgruppe und dieser Arbeit. Ohne die freundliche und motivierende Arbeitsatmosphäre, sowie ihre beeindruckende Expertise in Forschung und Klinik, wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Ebenso möchte ich mich vielmals bei meinem Mentor Dr. Markus Wirth bedanken, der in allen Fragen und Belangen stets ein kompetenter und prompter Ansprechpartner war. Die kritischen und konstruktiven Diskussionen, sowie seine umgehende Hilfe bereicherte die Arbeit enorm.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Henning Bier, der als Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Klinikums rechts der Isar die Räumlichkeiten und Mittel zur Verfügung stellte, ohne die die Arbeit nicht umgesetzt hätte werden können. Wir haben mit ihm einen großartigen Arzt und Menschen verloren.

Herrn Guido Piontek danke ich für die gewissenhafte Einarbeitung in die experimentellen Methoden. Er war stets kompetenter Ansprechpartner für methodische Fragen und seine Akribie war essenziell für die Qualität der Arbeit. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich ebenso bei Frau Marie Kristin Fritsche, Herrn Michael Siegl und Herrn Peter Strzelczyk, welche mir im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Abschließend bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung in Ausbildung und Studium, sowie bei meiner Freundin für ihre Geduld und Motivation während der Anfertigung der Arbeit.