

Aus der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Sieg

**Einfluss der Expression von SERPIN B2, Ki-67 und EGFR auf das  
Überleben von Patienten mit einem Rezidiv eines  
Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -



vorgelegt von  
Clara Taubitz  
aus Kiel

Lübeck 2025

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Samer Hakim
2. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den .....

Promotionskommission der Sektion Medizin

# I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	III
II. Abkürzungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung .....	1
1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie.....	1
1.1.3 Pathophysiologie .....	2
1.1.4 Diagnostik.....	3
1.1.5 Therapie .....	7
1.1.6 Rezidivierende OSCC.....	10
1.2 Ausgewählte Markerproteine in der Karzinogenese.....	12
1.2.1 SERPIN B2.....	12
1.2.2 Ki-67.....	14
1.2.3 EGFR.....	16
1.3 Fragestellung.....	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Untersuchungskohorte und klinische Datenerhebung.....	19
2.1.1 Einschlusskriterien .....	19
2.1.2 Ausschlusskriterien.....	19
2.2 Materialgewinnung und immunhistochemische Untersuchung.....	21
2.2.1 Tissue micro array (TMA).....	21
2.2.2 Immunhistochemische Methode .....	23
2.2.3 QuPath.....	23
2.2.4 Interpretation der immunhistochemischen Färbung.....	28
2.3 Statistische Auswertung .....	31
2.4 Ethik.....	31
3 Ergebnisse .....	32
3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs.....	32
3.2 Ergebnisse der Untersuchung von SERPIN B2 .....	34
3.2.1 Überlebensanalyse nach dem Rezidiv .....	35

3.2.2	Multivariate Analyse.....	38
3.3	Ergebnisse der Untersuchung von Ki-67.....	40
3.3.1	Überlebensanalyse nach dem Rezidiv .....	40
3.3.2	Multivariate Analyse.....	42
3.4	Ergebnisse der Untersuchung von EGFR.....	43
3.4.1	Überlebensanalyse nach dem Rezidiv .....	44
3.4.2	Multivariate Analyse.....	46
4	Diskussion .....	48
4.1	SERPIN B2.....	50
4.2	Ki-67 .....	53
4.3	EGFR.....	54
5	Zusammenfassung .....	58
III.	Abbildungsverzeichnis.....	59
IV.	Tabellenverzeichnis.....	61
V.	Literaturverzeichnis.....	62
VI.	Danksagungen .....	70
VII.	Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Bspw.	beispielsweise
Bzw.	beziehungsweise
Ca.	circa
CI	Konfidenzintervall
CPS	Combined Positive Score (kombinierter Positivitäts-Score)
CT	Computertomografie
d.F.	der Fälle
DOI	Depth of invasion (Invasionstiefe)
DVT	Digitale Volumentomografie
ELISA	Enzyme-linked-Immunesorbent Assay (Antikörper basiertes Nachweisverfahren)
EMA	European-medicines-agency (Europäische Arzneimittelagentur)
ENE	extranodal extension (extranodales Wachstum)
et al.	et alii
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2/neural
HNSCC	head- and neck squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom der Kopf- und Hals-Region)
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Hazard Ratio
IQR	Interquartilsabstand
MAPK	mitogen-activated protein-kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MRT	Magnetresonanztomografie
OPG	Orthopantomogramm
o.g.	oben genannte
OSCC	oral squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle)
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (SERPIN E1)
PAI-2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 2 (SERPIN B2)
PEG	Perkutane-endoskopische Gastrostomiesonde
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomografie und Computer-Tomografie
PI3K/Akt	Phosphoinositide 3-kinases/ Protein kinase B
pr DFS	krankheitsfreies Überleben post Rezidiv
pr OS	Gesamtüberleben post Rezidiv
ROI	Region of interest (Bereich von Interesse)
s.o.	siehe oben
SD	Mittelwert
TMA	Tissue Microarray
TME	Tumormikroumgebung
TNM	Tumor/Nodus/Metastase
tPA	Tissue Plasminogen Activator (Gewebe-Plasminogen-Aktivator)
u.a.	unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
uPA	urokinase-type plasminogen activator (Urokinase-Plasminogen-Aktivator)
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor (Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor)

# 1 Einleitung

## 1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Krebserkrankungen im Bereich der Mundhöhle und des Rachens stehen an sechster Stelle der häufigsten Krebserkrankungen weltweit [1]. Laut Robert Koch Institut lag die Inzidenz dieser Krebserkrankung im Jahr 2020 bei 13.190 von insgesamt 593.200 Neuerkrankungen aller Krebsarten. Zwischen 1999 und 2011 war die altersstandardisierte Neuerkrankungsrate noch angestiegen, während sich diese seit 2011 bei beiden Geschlechtern nahezu konstant zeigt [2]. Weltweit wird hingegen ein weiterer Anstieg der Inzidenz erwartet [3]. Dabei stellen besonders der Süden und Südosten Asiens Hochrisikogebiete für diese Tumorentität dar. Krebs in der Mundhöhle gilt hier als häufigste Krebserkrankung bei Männern und macht ca. 25% aller Krebsneuerkrankungen aus [4].

Es wird ein grundsätzlicher Unterschied in der Erkrankungshäufigkeit zwischen Männern und Frauen festgestellt, da Männer deutlich häufiger am Mundhöhlenkarzinom erkranken. Allein in Deutschland stellte dieser Krebs bei Männern im Jahr 2020 die neunthäufigste Krebserkrankung dar, bei Frauen steht Mundhöhlenkrebs hingegen an 14. Stelle der häufigsten Krebserkrankungen. Hinzutritt, dass Männer im Vergleich zu Frauen früher an diesem Krebs erkranken. Während das mittlere Erkrankungsalter bei Männern bei 65 liegt, erkranken Frauen durchschnittlich im Alter von 68 Jahren [2].

Krebs in der Mundhöhle kommt auch daher eine besondere Bedeutung zu, da die Prognose mit einer niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate eher schlecht ausfällt. Bei Frauen beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 64%, bei Männern 52%. Die 10-Jahres-Überlebensrate für Frauen liegt bei 53%, und bei Männern sogar bei nur 41% [5].

### 1.1.2 Ätiologie

Bei den malignen Tumoren der Mundhöhle handelt es sich um eine heterogene Gruppe solider Tumoren, deren deutlich überwiegenden Anteil die Plattenepithelkarzinome bilden. Seltener handelt es sich um Adenokarzinome [3, 5, 6]. Häufig geht das maligne Wachstum von den Schleimhäuten der Mundhöhle, des Naso-, Oro- und Hypopharynx aus [5, 6]. Im Bereich der Mundhöhle ist es häufig in der Innenwange, dem retromolaren Dreieck, dem Gaumen, der Zunge, dem Mundboden, dem Vestibulum und dem Lippenrot lokalisiert [3].

Die Ursache der Entstehung maligner Läsionen im Bereich der Mundhöhle ist dabei mit

bestimmten Risikofaktoren assoziiert. Hauptrisikofaktoren stellen in diesem Zusammenhang häufiger Konsum von Alkohol und Nikotin dar [7, 8]. Durch die Kombination von sowohl häufigem Alkohol- als auch Nikotinkonsum wird das Risiko zusätzlich multiplikativ erhöht [9]. Auch der Gebrauch von Kautabak stellt einen mit dem Rauchen von Tabak vergleichbaren Risikofaktor dar, ebenso wie das Kauen der Betelnuss, welches besonders in Südostasien verbreitet ist [10].

Weiterhin ist eine besonders fetthaltige Ernährung bestehend aus viel Fleisch und Gebratenem risikobehaftet. Diese kann die Entstehung von Krebs im Bereich der Mundhöhle begünstigen [11, 12].

Auch chronische Infektionen mit Hochrisikovarianten des humanen Papillomavirus (HPV) stellen einen häufig diskutierten Risikofaktor dar [13]. Dieser bezieht sich dabei eher auf Plattenepithelkarzinome im Bereich des Mundrachens (Oropharynx) als der Mundhöhle. Laut Ndiaye et al. (2014) beträgt die Prävalenz der HPV-DNA im Oropharynx mit 45,8% im Vergleich zur Mundhöhle mit 24,2% beinahe das Doppelte [14, 15]. Weiterhin werden auch genetisch prädisponierende Faktoren beschrieben [16].

### 1.1.3 Pathophysiologie

Wie bereits beschrieben handelt es sich bei den malignen Tumoren der Mundhöhle überwiegend um Plattenepithelkarzinome. Diese entstehen aus der epithelialen Auskleidung der Mundhöhle. Ein entscheidendes Kriterium des malignen Wachstums ist dabei die Invasion durch die Basalmembran, welche zu typischen klinischen Merkmalen wie bspw. Derbheit und einer fehlenden Verschieblichkeit zum Untergrund führt. Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigen sich zytologische Atypien mit nukleären und zellulären Pleomorphien und Anzeichen von Keratinisierung [17].

Grundsätzlich kommt es bei der Entstehung malignen Wachstums zu einem Ungleichgewicht in der Homöostase zwischen Zellproliferation und Zelltod, welche im gesunden Organismus besteht. Dieses Gleichgewicht verschiebt sich zugunsten der Zellproliferation. Durch Mutation fehlen hemmende Signale oder diese werden nicht erkannt und so wachsen die Krebszellen. Hierbei spielen Tumorsuppressorproteine und Protoonkoproteine eine wichtige Rolle. Tumorsuppressorproteine leiten Reparaturvorgänge innerhalb des Zellzyklus ein und können so ggf. den programmierten Zelltod veranlassen. Protoonkoproteine halten auf der Gegenseite Zellproliferation und Zelldifferenzierung aufrecht [18]. Veränderungen dieser Proteine können malignes Wachstum begünstigen.

Zudem wurde erstmals 1863 von Virchow et. al. das Konzept der Tumormikroumgebung (Tumor Microenvironment (TME)) beschrieben. Hierbei wird nicht-zellulären Bestandteilen der extrazellulären Matrix (ECM), aber auch zellulären Komponenten wie Immunzellen eine Rolle am Tumorentstehen zugeschrieben [19]. So fördert ein verändertes TME die Invasions- und Metastasierungseigenschaften von Tumorzellen [20]. Das Verständnis der Tumorentstehung hat sich in den letzten Jahren immer weiter vertieft und Immuntherapien, welche oben genannte Erkenntnisse zur Grundlage haben, gewinnen weiter an Bedeutung.

#### 1.1.4 Diagnostik

Die Diagnosestellung von Tumoren der Mundhöhle erfolgt oft verspätet. Grund dafür ist ein schmerzloses Tumorwachstum, welches den Patienten nicht zu einer Abklärungsuntersuchung veranlasst. Eine wichtige Bedeutung kommt daher regelmäßigen Untersuchungen der Mundschleimhaut zu, die sowohl von Zahnärzten, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen als auch von Hausärzten durchgeführt werden sollten. Auch das Hautkrebscreening beim Hautarzt schließt die Inspektion der Mundschleimhaut mit ein [3, 21].

Ein Tumor der Mundhöhlenschleimhaut zeigt häufig ein exophytisches (Gewebeüberschuss), manchmal jedoch ein endophytisches Wachstumsmuster (Gewebedefekt). Ein fortgeschrittenes Wachstum kann auch zu Behinderung der Mundöffnung oder Schwierigkeiten bei Schlucken, Kauen und Sprechen führen.

Grundsätzlich gilt laut der aktuellen Leitlinie des AMWF, dass bei auffälligen und unklaren Befunden, die länger als zwei Wochen andauern, weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden sollten [3].

Zur Sicherung der Diagnose gilt bei dem Verdacht auf ein Mundhöhlenkarzinom besonders die histopathologische Untersuchung durch eine Probenentnahme als Goldstandard. Für das darauffolgende Staging ist insbesondere die bildgebende Diagnostik zur Beurteilung der genauen Tumorlokalisierung und -ausbreitung entscheidend.

Zur Bestimmung der Tumorausdehnung ist insbesondere die kontrastmittelgesteuerte CT-Untersuchung der Kopf-Hals Region aufgrund ihrer häufig einfachen Verfügbarkeit und kurzen Untersuchungsdauer von großer Bedeutung. Das MRT kann als Alternative zur CT-Untersuchung eingesetzt werden, was insbesondere bei Kontrastmittelunverträglichkeit oder hoher Artefaktlast (bei metallischen dentalen Konstruktionen) bei der Darstellung von Weichteilen hilfreich sein kann. Auch ein ergänzendes PET-CT kann die Sensitivität der

Darstellung erhöhen [3, 22]. Es werden häufig weitere Untersuchungen herangezogen. Wichtig zu nennen sind hier die in der zahnärztlichen Diagnostik häufig eingesetzten Verfahren des Orthopantomogrammes (OPG) und der digitalen Volumentomografie (DVT) zur zusätzlichen Beurteilung der Knocheninvasion [23].

Zur Darstellung von lokoregionären Lymphknoten sind CT und MRT ebenfalls besonders sensitiv. Auch die sonographische Untersuchung des Halses wird hierfür standardmäßig eingesetzt, Letztere ist aber in der Sensitivität den anderen Verfahren unterlegen und wird eher ergänzend eingesetzt [24]. Daneben spielen ebenfalls die Pharyngoskopie oder ein CT des Thorax in besonderen Situationen zur Beurteilung von Tumorausdehnung bzw. des möglichen Vorliegens von Zweittumoren oder Fernmetastasen eine Rolle [3].

#### 1.1.4.1 TNM-Klassifikation

Mit Hilfe der oben beschriebenen Staging-Untersuchungen wird eine erste Klassifikation des Tumors vorgenommen. Dies erfolgt orientiert an der UICC-TNM-Klassifikation der malignen Tumoren [3], welche vom American Joint Committee on Cancer und der International Union for Cancer Control entwickelt wurde und seit ca. 60 Jahren zur Standardisierung von Krebserkrankungen genutzt wird [25].

Anhand dessen werden Tumoren in Bezug auf ihre Größe und anatomische Ausdehnung, regionale Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen klassifiziert [3]. Die Klassifikation anhand des TNM-Systems ermöglicht eine standardisierte und somit vergleichbare anatomisch basierte Stadieneinteilung. Sie ist wichtig für die Planung der Behandlung, für eine Aussage über die Prognose und für Forschungsfragen. Um die klinische Relevanz stets aufrecht zu erhalten, unterliegt diese Klassifikation regelmäßigen Aktualisierungen. Die letzte Aktualisierung wurde 2017 in der 8. Auflage veröffentlicht. Aktualisierungen beruhen zumeist auf Tumorbiologie und klinischem Verhalten, auf technischen Fortschritten in Diagnose und Behandlung oder auf neuen Erkenntnissen über prognostische Faktoren und Risikostratifizierung. In der neuesten Auflage wurden u.a. für alle nicht-viralen Kopf-Hals-Tumoren die sog. DOI-Variable zur Beurteilung der Invasionstiefe und die ENE-Variable zur Beschreibung extranodaler Ausdehnung von Lymphknotenmetastasen in die Klassifikation aufgenommen [26].

Nach Abschluss der Staging-Untersuchungen erfolgt eine erste Einteilung anhand der TNM-Klassifikation, welche mit dem Präfix „c“ gekennzeichnet wird, was für die Grundlage der klinischen Beurteilung steht. Wird sich im Verlauf der Therapie für eine Tumoresektion entschieden, wird das entnommene Tumorgewebe auch pathologisch beurteilt. Dabei kann eine neue, pathologische TNM-Klassifikation des Tumors erfolgen, welche dann mit dem Präfix „p“

beschrieben wird [27]. Hierfür kann die Klassifikation weiter ergänzt werden durch den Zustand des Resektionsrandes, einer möglichen Lymphgefäßinvasion sowie Gefäßinvasion und auch durch die Beurteilung des Differenzierungsgrades des Tumorgewebes unter dem Namen „Grading“.

Beim Auftreten eines Rezidivtumors wird bei der Erhebung des Tumorstadiums das Präfix „r“ zur Kennzeichnung genutzt [27].

Die Kriterien der TNM-Klassifikation für Tumorausdehnung (T), regionäre Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) sind in den nachfolgenden Tabellen 1, 2 und 3 dargestellt. Ergänzend wird auch die UICC-Klassifikation simultan zur TNM-Klassifikation genutzt. In Tabelle 4 ist die UICC-Klassifikation abgebildet, die die Stadien aller Krebserkrankungen nach der TNM-Klassifikation in fünf Stadiengruppen zusammenfasst [27].

**Tabelle 1:** T-Klassifikation (Tumorausdehnung) für Mundhöhlenkarzinome aus der TNM-Klassifikation der malignen Tumore, 8.Auflage [3, 27]

T-Klassifikation	Definition
<b>T<sub>x</sub></b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T<sub>0</sub></b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>T<sub>is</sub></b>	Carcinoma in situ
<b>T<sub>1</sub></b>	Größte Tumorausdehnung ≤ 2cm, Invasionstiefe (depth of invasion, DOI) ≤ 5mm
<b>T<sub>2</sub></b>	Größte Tumorausdehnung ≤ 2cm, DOI > 5mm und ≤ 10mm ODER Tumor > 2cm aber ≤ 4cm, und DOI ≤ 10mm
<b>T<sub>3</sub></b>	Größte Tumorausdehnung > 4cm ODER jeder Tumor > 10mm DOI
<b>T<sub>4a</sub></b>	Mundhöhle: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, äußere Zungenmuskulatur (M. genioglossus, M. hypoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
<b>T<sub>4b</sub></b>	Lippe und Mundhöhle: Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Proc. pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

**Tabelle 2:** N-Klassifikation (regionäre Lymphknotenmetastasen) für Mundhöhlenkarzinome aus der TNM-Klassifikation der malignen Tumore, 8.Auflage [3, 27]

N-Klassifikation	Definition
<b>Nx</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten $\leq 3$ cm und ENE (-)
<b>N2a</b>	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten bis 3cm und ENE (+); oder Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten 3 bis 6 cm und ENE (-)
<b>N2b</b>	Metastasen in multiplen, ipsilateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm und ENE (-)
<b>N2c</b>	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm und ENE (-)
<b>N3a</b>	Metastase in solitärem Lymphknoten größer 6 cm und ENE (-)
<b>N3b</b>	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten $> 3$ cm und ENE (+); ODER Metastase in multiplen ipsilateralen, kontralateralen ODER bilateralen Lymphknoten, davon mindestens eine ENE(+); ODER Metastase in einem solitären kontralateralen Lymphknoten, $\leq 3$ cm und ENE(+)

ENE = extranodal extension: extranodales Wachstum

**Tabelle 3:** M-Klassifikation (Metastasierung) für Mundhöhlenkarzinome aus der TNM-Klassifikation der malignen Tumore, 8.Auflage [3, 27]

M-Klassifikation	Definition
<b>Mx</b>	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastase(n)

**Tabelle 4:** Tumorstadien nach UICC-Kriterien aus der TNM-Klassifikation der malignen Tumore, 8.Auflage [3, 27]

Stadium	T	N	M
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>III</b>	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
<b>IVA</b>	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
<b>IVB</b>	T4b	jedes N	M0
	jedes T	N3	M0
<b>IVC</b>	jedes T	jedes N	M1

#### 1.1.5 Therapie

Die Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms wird grundsätzlich unterschieden zwischen kurativer - also dem Ziel der vollständigen Heilung des Patienten - und palliativer Therapie - der Linderung der Symptome und Verbesserung von Lebensqualität. Es ist die Vorgabe der Deutschen Krebsgesellschaft, eine gemeinsame Therapieempfehlung im Rahmen des sog. Interdisziplinären Tumorboards unter Zusammenarbeit eines Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen, eines Hals-, Nasen-, Ohrenarztes, eines Strahlentherapeuten, eines Onkologen, eines Pathologen und ggf. weiterer Akteure zu treffen. Die Entscheidung über die Therapie erfolgt schlussendlich nach ausführlicher Aufklärung in einem sog. shared-decision-making gemeinsam mit dem Patienten [3].

Die Möglichkeiten der kurativen Behandlung des oralen Plattenepithelkarzinoms bestehen aus der alleinigen chirurgischen Therapie oder der chirurgischen Therapie in Kombination mit Radiatio oder Radiochemotherapie sowie der alleinigen Radio- bzw. Radiochemotherapie [3].

##### 1.1.5.1 Chirurgische Therapie

Die Resektion des Tumors ist abhängig von Lage und Größe des Tumors und daraus folgenden funktionellen und ästhetischen Konsequenzen der Behandlung. Ziel ist stets die dauerhafte

lokoregionäre Tumorkontrolle bei geringer Beeinträchtigung der Lebensqualität durch Erhalt der Phonation, der Artikulation und der Kau- und Schluckfunktion.

Kleine Tumoren (T1/T2) können sowohl durch chirurgische Resektion als auch durch alleinige Radiatio kurativ behandelt werden. Größere Tumoren (T3/T4) zeigen jedoch unter alleiniger Radiatio mit oder ohne Chemotherapie höhere Rezidivraten [3, 28].

Insbesondere die Resektabilität des Tumors sollte bei der chirurgischen Therapie berücksichtigt werden, da die Prognose bei knappen oder positiven Resektionsrändern signifikant schlechter ausfällt [29]. Zum Erreichen tumorfreier Resektionsränder kann auch die Entfernung von relevanten anatomischen Strukturen wie der Kieferknochen notwendig werden [30].

Die Resektion des Tumors erfordert meist eine Rekonstruktion im Bereich des OP-Gebietes. Diese sollte bei jedem Patienten individuell je nach anatomischer Situation, der erwarteten funktionellen Ausfälle erfolgen [3].

#### 1.1.5.2 Neck Dissection (Lymphadenektomie)

In 20-40% der Fälle zeigen sich okkulte Lymphknotenmetastasen. Bei präoperativer cN0 Beurteilung zeigen sich demnach intraoperativ befallene Lymphknotenmetastasen [31]. Dies führt dazu, dass auch bei präoperativ unauffälligen Halslymphknoten eine Ausräumung dieser empfohlen wird.

Die Ausräumung der Halslymphknoten wird auch Neck Dissection genannt und wird klinisch-anatomisch innerhalb der sechs Lymphknotenlevel nach Robbins vorgenommen. Das Ausmaß der Neck Dissection ist abhängig von der Lokalisation des Tumors sowie dem präoperativem Lymphknotenstatus (cN). Man unterscheidet die selektive Neck Dissection, welche in der Regel auf die Level I-III beschränkt ist, von der modifiziert radikalen Neck Dissection, welche sich über die Level I-V erstreckt und der radikalen Neck Dissection, welche zusätzlich zur Ausräumung der Level I-V auch die Entfernung nicht-lymphatischer Strukturen wie des N.accessorius, der V.jugularis und des M.sternocleidomastoideus beinhaltet. Die radikale Neck Dissection führt zu einer starken Minderung der Lebensqualität bei gleichzeitig nur geringem Überlebensvorteil und wird daher heutzutage nur selten eingesetzt [3].

Die aktuelle Empfehlung der Leitlinie sieht bei cN0-Status eine selektive Neck Dissection vor. Diese sollte auf Level IV-V erweitert werden, wenn es zu einem histopathologischen Nachweis eines befallenen Lymphknotens in den ausgeräumten Leveln I-III kommt. Außerdem wird in diesem Zusammenhang eine adjuvante Radiatio angeraten [3]. Liegt ein cN+ Status vor, wird die modifizierte radikale Neck Dissection empfohlen. Bei steigender T-Kategorie, bei dem

Befall mehrerer Lymphknoten oder bei mittelliniennahen oder -überschreitenden Befunden sollte ebenfalls die selektive Neck Dissection der kontralateralen Halsseite erfolgen [3, 32].

#### 1.1.5.3 Radiatio

Auch bei der Behandlung des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle wird die ionisierende Strahlung kurativ und palliativ eingesetzt.

Die Indikation zur kurativen Radiatio besteht laut Leitlinie bei größeren Tumoren (T3/T4), bei knappen oder positiven Resektionsrändern nach Tumorresektion (R1), bei perineuraler Tumordinvasion, bei Gefäßinvasion oder bei positivem Lymphknotenbefall. Meist findet die Radiatio adjuvant, also postoperativ Einsatz [3, 33].

Bei Patienten mit kleinen Tumoren insbesondere im Bereich der Zunge oder des Mundbodens kann in ausgewählten Fällen auch eine interstitielle Brachytherapie vergleichbare lokale Tumorkontrollraten, wie eine alleinige chirurgische Therapie zeigen [3, 34].

Vor Beginn einer Strahlentherapie ist die zahnärztliche Beurteilung und ggf. Behandlung des Patienten sehr wichtig, um Strahlenschäden wie Strahlenkaries oder einer Radioosteonekrose vorzubeugen. Weitere, die Lebensqualität stark einschränkende Nebenwirkungen sind insbesondere die Mukositis und die Strahlendermatitis. Aufgrund dessen sind die zahnärztliche Behandlung vor Strahlentherapiebeginn, die Anpassung und Nutzung einer Fluoridierungsschiene während der Behandlung sowie weitere prophylaktische Maßnahmen wie Spüllösungen und Salben von besonderer Bedeutung [35, 36].

#### 1.1.5.4 Chemotherapie

Eine alleinige Chemotherapie hat beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle keinen kurativen Effekt. In Kombination mit einer Radiatio besteht aber eine deutlich verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit [3, 37]. Die größte Bedeutung wird dem Chemotherapeutikum Cisplatin zugesprochen, da es in alleiniger Gabe den besten Effekt zeigt [37]. Aber auch Carboplatin kommt als platinbasiertes Zytostatikum insbesondere bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion aufgrund seines vergleichsweise geringeren nephrotoxischen Nebenwirkungsprofils zum Einsatz [38].

Insgesamt kommt es durch die Kombination aus Radiatio und Chemotherapie aber auch zu einer signifikanten Erhöhung der akuten Strahlentoxizität [3]. Die Indikation zum Einsatz der kombinierten Radiochemotherapie besteht daher bei Patienten, welche eine Radiatio erhalten und zusätzlich - aufgrund eines knappen oder positiven Resektionsrandes, eines extrakapsulären

Tumorstadium oder Lymphknotenmetastasen - ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv haben [39].

#### 1.1.5.5 Nachsorge

In 20% der Fälle entwickeln Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ein Tumorrezidiv. Aus diesem Grund kommt den regelmäßigen Nachsorgeuntersuchungen nach Abschluss der Behandlung des Primärtumors eine besondere Bedeutung zu. In den ersten zwei Jahren sollten die Nachsorgetermine in einem Abstand von drei Monaten stattfinden, ab dem dritten Jahr in einem Abstand von sechs Monaten. Dem liegt zugrunde, dass 76% der Rezidive innerhalb der ersten zwei Jahre auftreten [40]. Die Nachsorgeuntersuchungen sollten sowohl eine klinische als auch eine sonographische Untersuchung der Mundhöhle und des Halses umfassen. So sollen Rezidive möglichst früh erkannt werden [3].

#### 1.1.6 Rezidivierende OSCC

Der häufigste Grund für ein tumorbedingtes Versterben bei der Erkrankung an einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist das Auftreten eines lokoregionären Tumorrezidivs. Wie in Kapitel 1.1.5.5 bereits beschrieben betrifft dies ca. 1/5 der Patienten [3].

Bei Auftreten eines Rezidivs gibt es weiterhin kurative Behandlungsoptionen, wie die erneute chirurgische Resektion in Kombination mit Strahlen- und/oder Chemotherapie. Auch hier sollte ein Abwägen der Gesamtsituation erfolgen mit Berücksichtigung der Resektabilität, der vorausgegangenen Behandlung und des Allgemeinzustandes des Patienten, welche vor Therapiebeginn im Interdisziplinären Tumorboard besprochen wird [3]. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach einer chirurgischen Resektion eines Tumorrezidives bei Patienten, welche bereits eine Bestrahlung des Primärtumors erhalten haben liegt bei 43,4% [41].

Eine alternative Therapie bietet die Brachytherapie für besonders kleine und früh erkannte Tumorrezidive (Stadium T1/2) mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 30% [42]. Größere nicht-resektable Rezidivtumore können mit perkutaner Strahlentherapie behandelt werden, welche zusätzlich mit einer Chemotherapie kombiniert werden kann [3].

Ist eine Tumorresektion aus etwa anatomischen Gründen nicht mehr möglich und ist gleichzeitig von einer Radiatio keine kurative Wirkung mehr zu erwarten, ist der Allgemeinzustand des Patienten stark reduziert oder bestehen Fernmetastasen so wird der Patient nicht mehr kurativ, sondern palliativ behandelt. In der palliativen Therapie wird die lebenslimitierende Situation der Erkrankung angenommen und ein Fokus auf die Symptombehandlung gelegt, wozu auch die lokale Tumorkontrolle gehört. In der

Palliativtherapie der Mundhöhlenkarzinome wird die Immuntherapie eingesetzt. Erstlinientherapie in der palliativen Situation des Plattenepithelkarzinomes der Mundhöhle ist laut der aktuellen Leitlinie eine Kombinationstherapie bestehend aus dem monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab mit einem platinbasierten Chemotherapeutikum wie Cisplatin und 5-Fluoruracil. Hierunter zeigen sich gute Ansprechraten bei einer verbesserten Lebensqualität mit weniger tumorbedingten Symptomen. Im Abstand von 6-12 Wochen sollten zur Progresskontrolle regelmäßige Schnittbildgebungen erfolgen [3]. Besteht unter dieser Erstlinientherapie nach sechs Monaten ein weiterer Tumorprogress wird ein Umstieg auf eine Zweitlinientherapie mit Nivolumab, einem monoklonalen PD1-Antikörper empfohlen [43]. Auch Pembrolizumab - ein gegen den PD1-Rezeptor gerichteter Antikörper - findet insbesondere in der Therapie von Patienten mit PD-L1 exprimierenden Tumor- oder Immunzellen Einsatz.

Weitere wichtige Maßnahmen insbesondere in der palliativen Behandlung können je nach Situation und Ergehen des Patienten die Anlage eines Tracheostomas zur Sicherung des Atemweges und die Anlage einer perkutanen-endoskopischen-Gastrostomiesonde (PEG) zum Erhalt der Nährstoffzufuhr sein [3].

## 1.2 Ausgewählte Markerproteine in der Karzinogenese

### 1.2.1 SERPIN B2

SERPIN B2 ist ein Protein, welches zur Superfamilie der Serpine gezählt wird. Es handelt sich hierbei um Serinprotease-Inhibitoren, also proteolytische Enzyme, die eine gemeinsame Primärstruktur aufweisen. Bisher konnten im menschlichen Körper 34 Serpine aus neun Kladen identifiziert werden, die sich in ihrer differenzierten Struktur und in funktionellen Eigenschaften unterscheiden. Sie tragen eine Bedeutung für zahlreiche physiologische Prozesse im menschlichen Körper wie etwa bei der Blutgerinnung, der Fibrinolyse und im Rahmen von Entzündungsreaktionen. Daraus resultiert bei Fehlfunktion der Serpine auch ihre Beteiligung an Pathologien wie der Entstehung malignen Wachstums [44].

Bekannte Serpine sind insbesondere Antithrombin (AT, SERPIN C1), welches sich gegen Gerinnungsfaktoren richtet und dadurch Gerinnung hemmt oder  $\alpha$ 1-Antitrypsin (SERPIN A1), das die Aktivität der neutrophilen Elastase hemmt und Gewebe vor dessen Angriff und einem folgenden Abbau schützt. Ferner ist die C1-Esterase (C1-INH, SERPIN G1) mit einer regulierenden Rolle im klassischen Komplementweg zu nennen [45].

Bei der Entstehung von Tumoren müssen Tumorzellen umliegende Gewebebarrieren überwinden und abbauen. In diesem Rahmen sind verschiedene zelluläre Funktionen notwendig. Die proteolytische Aktivität spielt hierbei eine wichtige Rolle. Serinproteasen können einerseits durch Einleitung von Proteolyse Gewebewachstum und -ausbreitung hemmen, gleichzeitig können sie aber durch Proteolyse bereits proteolytisch wirkender Faktoren auch Wachstum, Invasion und Metastasierung von Krebszellen fördern oder induzieren [46].

SERPIN B2 ist auch bekannt unter dem Namen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 2 (PAI-2), da es in der Regel als Inhibitor der Protease Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) und in geringem Maße auch als Inhibitor des Gewebe-Plasminogen-Aktivators (tPA) beschrieben wird. Beide genannten Proteasen wandeln Plasminogen in die aktive Protease Plasmin um. Plasmin wiederum ist an Fibrinolyse und Thrombolyse, aber auch am Abbau zellulärer Matrix beteiligt [47]. Auch wenn SERPIN B2 nachgewiesenermaßen uPA und tPA inhibiert, konnte bisher kein sicherer in-vivo-Nachweis einer Wirkung von SERPIN B2 auf Fibrinolyse und Thrombolyse gezeigt werden [48]. tPA und uPA sind sich in ihrer Struktur sehr ähnlich, werden aber von unterschiedlichen Genen kodiert. Während die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin durch tPA vermehrt Einfluss auf Fibrinolyse und Thrombolyse zeigt, so hat durch uPA katalysiertes Plasmin einen größeren Einfluss auf den Abbau zellulärer Matrix. Diese als sog. „uPA-System“ bezeichnete Signalkaskade ist an der Zellmetastasierung beteiligt und hat

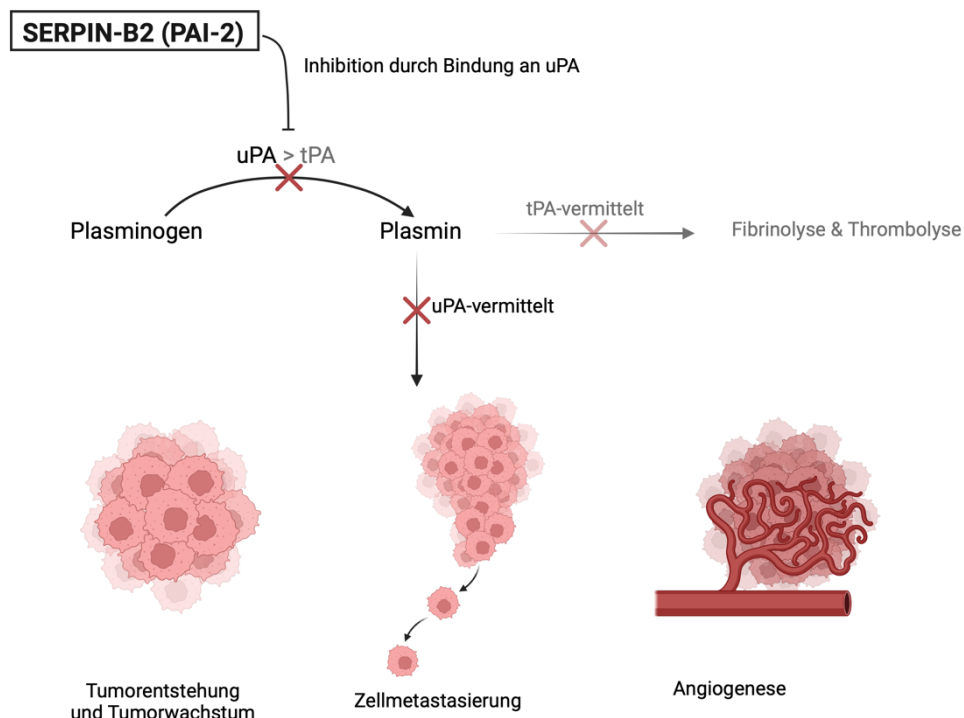
Einfluss auf Tumorentstehung und -wachstum, Zellproliferation, Zellmigration, Zelladhäsion, Angiogenese und Intravasation [49-51]. Durch Bindung von uPA an den Zellmembranrezeptor uPAR kommt es zur Aktivierung eines intrazellulären Signalweges und somit zu o.g. Zell- und Gewebeentwicklungen. SERPIN B2 hemmt durch Bindung an das extrazelluläre uPA und Ausbildung eines Komplexes mit diesem die Bindung von uPA an den Rezeptor uPAR und blockiert somit die genannte Signalkaskade [52-54]. Wie so oft wird postuliert, dass diese Prozesse sich physiologischerweise in Waage halten, bei Entartung allerdings kommt es zum Ungleichgewicht.

Es ist umstritten, wie das in der Regel im Zytoplasma befindliche SERPIN B2 zu seinem mutmaßlichen Hauptziel uPA im extrazellulären Milieu gelangen könnte [48]. SERPIN B2 werden in klinischen Studien außerdem sowohl tumorfördernde als auch tumorhemmende Wirkungen zugeschrieben.

M. Valiente et al. konnten 2014 bei erhöhter Expression von SERPIN B2 ein gesteigertes Wachstum und die Entstehung von Hirnmetastasen feststellen. Plasmin zeigt hier in reaktivem Hirnstroma physiologischerweise eine Abwehrfunktion gegen invasives metastatisches Tumorwachstum. Die hemmende Wirkung von SERPIN B2 auf die Bildung von Plasmin führt in diesem Fall also vermutlich zu diesem verstärkten malignen Wachstum. In hirnmetastasierenden Zellen von Lungen- und Brustkrebs konnte eben diese erhöhte Expression von SERPIN B2 erfasst werden, welche wie beschrieben, die Krebszellen vor dem durch Plasmin ausgelösten Zelltod schützt [55].

Andererseits postulierten W.A. Schroder et al. 2014 in In-vitro-Studien, dass eine hohe Expression von SERPIN B2 durch Wirkung auf uPA in Oberflächenmikropartikeln von Krebszellen eine Unterdrückung von Tumorzellmigration und -invasion und somit auch auf Metastasierung bewirkt [56].

Insgesamt wird SERPIN B2 demzufolge eine Vielzahl an Funktionen und Aktivitäten zugeschrieben. Insbesondere der Einfluss von SERPIN B2 im Bereich der Onkogenese variiert je nach Tumorentität [54, 57]. Da kein klarer Konsens über die physiologische Rolle besteht, wird SERPIN B2 auch als „unentschlossenes Serpin“ bezeichnet [48].



**Abbildung 1:** Vereinfachte schematische Darstellung der Rolle von SERPIN B2 in der Krebsbiologie anhand des uPA-Signalweges, erstellt mit BioRender.com.

### 1.2.2 Ki-67

Das Antigen des Proteins Ki-67 wurde erstmals in den frühen 1980er Jahren mithilfe monoklonaler Maus-Antikörper gegen ein nukleäres Antigen aus einer Zelllinie der Hodgkin-Lymphome entdeckt. Benannt ist das Protein nach der Stadt Kiel - dem Standort der Entdeckung - sowie der Klonnummer 67 [58].

Ki-67 ist ein Proliferationsmarker. Es liegt in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus in unterschiedlicher Konzentration im Zellkern vor. Die Expression steigt von der G1-Phase bis zur Mitose an und nimmt unmittelbar nach der Mitose wieder ab. Ki-67 kann in den Zellkernen von Zellen demnach während der Teilungsphasen nachgewiesen werden, nicht aber während der Ruhephasen des Zellzyklus. Die Expressionsrate von Ki-67 lässt folglich Rückschlüsse auf die Zellteilungsrate von Zellen eines bestimmten Gewebes zu [59].

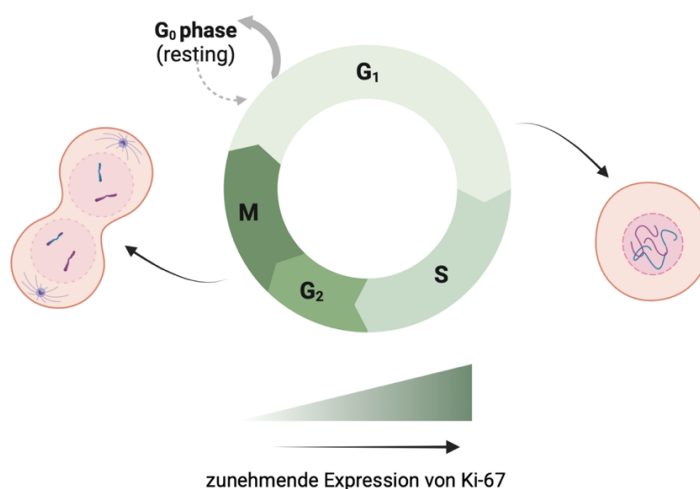
Als Proliferationsmarker spielt Ki-67 eine wichtige Rolle in der Diagnostik verschiedener Tumorentitäten und zeigt sich besonders in gering differenzierten Krebsgeweben stark exprimiert. Es stellt einen Biomarker für die Prognose von soliden Tumoren dar [59]. Bei kleinzelligem Lungenkarzinom kann eine durch Ki-67 festgestellte hohe proliferative Aktivität Hinweis für eine erhöhte Bösartigkeit, höhere Anzahl an Rezidiven oder Metastasenentstehung

sein und somit auf eine schlechtere Prognose hindeuten [60]. Auch beim Prostatakarzinom wird eine Hochregulierung von Ki-67 mit der Aggressivität des Karzinoms in Verbindung gebracht [61].

Insbesondere beim invasiven Mamma-CA wird zusätzlich zu Hormonrezeptorstatus und HER2neu-Status durch immunhistochemischen Nachweis die Proliferationsrate durch Ki-67 dargestellt [62]. Diese durch Ki-67 bestimmte Proliferationsrate soll auch Informationen über das Ansprechen auf eine Chemotherapie und die Prognose von Patienten mit neoadjuvanter Behandlung liefern. So können Patientengruppen identifiziert werden, die eher nicht von einer Chemotherapie profitieren können wie Patienten mit HER2-negativen und Hormonrezeptor-positiven Tumoren mit geringer Proliferation [63].

Bei oralem Plattenepithelkarzinom konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Ki-67-Expression und Tumorgrading festgestellt werden. V. Gupta et al. konnten aufweisen, dass sich von normaler oraler Schleimhaut über orale epitheliale Dysplasien bis hin zu oralem Plattenepithelkarzinom ein konsistenter und progressiver Anstieg der Ki-67-Expression zeigt [64].

Die physiologische Funktion von Ki-67 ist allerdings weniger in der Zellproliferation zu finden, sondern spielt eine Rolle in der subzellulären Organisation. N. Andrés-Sánchez et al. postulierten 2022, dass Ki-67 aufgrund seiner Lokalisierung im perinukleolaren Heterochromatin am ehesten als Gerüst für die Bildung von phasentrennten Kompartimenten dienen könne [65]. Dies zeigt, dass Ki-67 eher weniger ein direktes therapeutisches Zielmolekül darstellt, als seine Wichtigkeit vielmehr in der prognostischen Aussagekraft liegt.



**Abbildung 2:** Ki-67 Expression in verschiedenen Phasen des Zellzyklus, erstellt mit BioRender.com.

### 1.2.3 EGFR

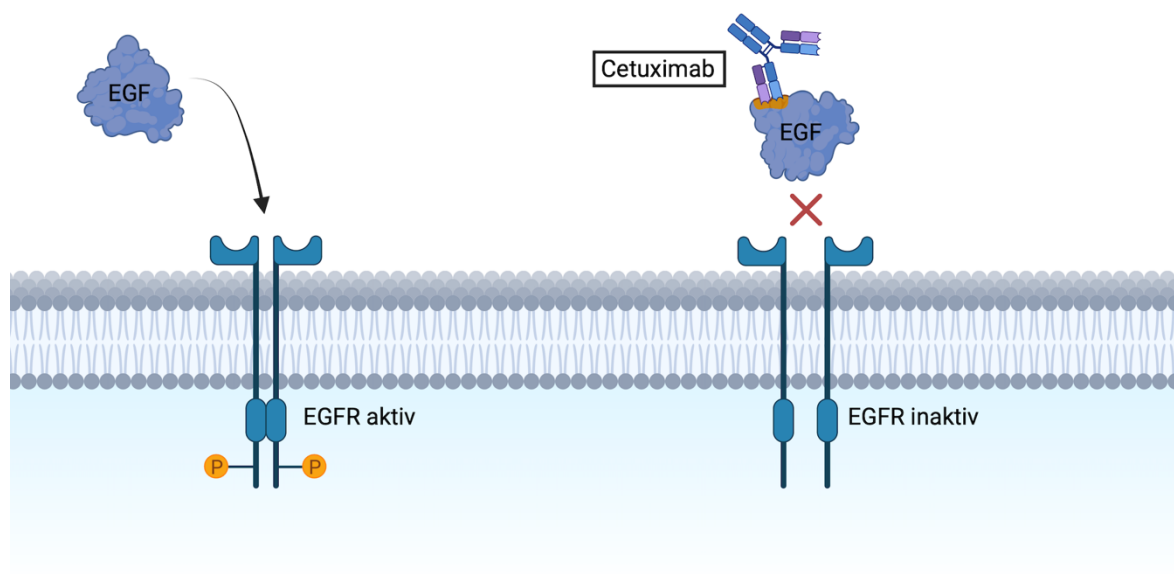
Das Akronym EGFR steht für „epidermal growth factor receptor“. Es handelt sich hierbei um einen Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität, der in der nachfolgenden Abbildung 3 dargestellt wird. Durch extrazelluläre Bindung von Liganden wie bspw. der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) oder der transformierende Wachstumsfaktor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) kommt es zur Aktivierung des Rezeptors und folglich zu einer Signalübertragung ins Zellinnere [66]. Dies geschieht, da durch die Ligandenbindung eine Konformitätsänderung zu Dimerisierung und Autophosphorylierung von Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors führt. Die nun phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstelle für intrazelluläre Signalproteine, welche nun verschiedene Signalkaskaden im Zellinneren aktivieren und so eine zelluläre Antwort je nach Art des Liganden und der Zelle bewirken [67, 68]. Zwei zentrale aktivierte Signalkaskaden sind PI3K/Akt und MAPK, die zur Aktivierung proliferativer Gene führen [69, 70].

EGFR gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren und führt physiologischerweise durch Ligandenbindung zu Zelltod und -proliferation, Zellmotilität, Angiogenese. Zudem ist es auch an der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix beteiligt. Es handelt sich um einen Wachstumsfaktor-Rezeptor [71].

Es ist in Bezug auf verschiedene Tumorarten beschrieben, dass EGFR in hoher Konzentration vorliegt oder in mutierter Form vorgefunden wird, wodurch es zu unkontrolliertem Tumorwachstum kommt [66]. Aufgrund dessen ist EGFR ein Zielprotein für Krebsbekämpfungsstrategien in verschiedenen Tumorentitäten. Es wurden bereits verschiedene gezielte Therapien entwickelt, die auf diesen Rezeptor abzielen und so als sogenannte „gezielte Krebstherapie“ bzw. „targeted therapy“ in Abgrenzung zu etwaiger klassischer Chemotherapie genutzt werden können. Hierbei werden Tyrosinkinase-Inhibitoren wie u.a. Erlotinib, Gefitinib und Osimertinib, die den intrazellulären Anteil der beschriebenen Tyrosinkinase EGFR blockieren, von monoklonalen Anti-EGFR-Antikörpern unterscheiden. Die Antikörper verhindern eine Ligandenbindung und infolgedessen die Rezeptoraktivierung, indem sie selber an den extrazellulären Anteil der Tyrosinkinase binden [66, 72].

Beim oralen Plattenepithelkarzinom zeigt sich EGFR häufig überexprimiert und geht mit einem aggressiven Phänotyp sowie schlechter Prognose einher [73]. Cetuximab ist einer der bereits erwähnten monoklonalen Antikörper, die gegen EGFR gerichtet sind. Dieser Antikörper ist bereits als Immuntherapie bei fortgeschrittenem oralen Plattenepithelkarzinom zugelassen. Es wird in Kombination mit einer platinbasierten Chemotherapie in der palliativen

Erstlinientherapie des rezidierten oder metastasierten Plattenepithelkarzinoms der Kopf-Hals-Region eingesetzt. Die bereits genannten Tyrosinkinase-Inhibitoren zeigten hingegen keinen signifikanten Nutzen bei gleichzeitig hohen Raten an unerwünschten Nebenwirkungen in der Behandlung von oralem Plattenepithelkarzinom [3].



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors, links in aktiver Form durch Bindung des Liganden EGF, rechts in inaktiver Form durch Hemmung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab, erstellt mit BioRender.com.

### 1.3 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der Frage nach dem Einfluss der Expression der drei beschriebenen Markerproteine SERPIN B2, Ki-67 und EGFR auf die Überlebenszeit von Patienten mit einem Rezidivtumor eines OSCC auseinander. Sie umfasst eine Bewertung der Expression dieser Proteine anhand der immunhistochemischen Reaktion im Tumorgewebe der Rezidivtumoren innerhalb einer prospektiv angelegten Patientenkohorte.

SERPIN B2 ist in seiner Auswirkung auf das orale Plattenepithelkarzinom bisher kaum Gegenstand der Forschung gewesen. Dieses Markerprotein zeigt aber bei verschiedenen Krebsarten unterschiedliche klinische Auswirkungen. Ziel der hier zugrundeliegenden Studie ist die Untersuchung der Hypothese, dass eine hohe Expression von SERPIN B2 sich auch auf die Überlebenszeit von Patienten mit rezidiviertem oralem Plattenepithelkarzinom auswirke.

Ki-67 ist ein bekannter und bereits viel eingesetzter prognostischer Marker der Onkogenese. Bisher konnte ein Zusammenhang zwischen einer hohen Ki-67-Expression und einer fortgeschrittenen Gewebeentartung oraler Schleimhaut festgestellt werden. Hinsichtlich Ki-67 untersuchten wir die Hypothese, dass eine hohe Ki-67-Expression im Gewebe rezidivierter oraler Plattenepithelkarzinome mit einer verminderten Überlebenszeit betroffener Patienten einhergehe.

EGFR ist als Wachstumsfaktor bereits Zielstruktur in der Therapie fortgeschrittener oraler Plattenepithelkarzinome. Eine hohe Expression dieses Markerproteins kann bereits mit einem aggressiveren Phänotyp dieser Tumorentität assoziiert werden. Es gibt bisher aber keine Aussage darüber, ob dies auch auf Rezidivtumoren übertragbar ist. Der vorliegenden Bearbeitung liegt auch in Bezug auf EGFR die Hypothese zugrunde, dass eine hohe EGFR-Expression in Geweben von Patienten mit einem Tumorrezidiv eines oralen Plattenepithelkarzinoms mit einer verminderten Überlebenszeit einhergehe.

Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Studie, welche die Überlebenszeit nach einem Rezidiv eines oralen Plattenepithelkarzinoms in Abhängigkeit zur Expression der genannten Markerproteine untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungskohorte und klinische Datenerhebung

Die vorliegende Studie umfasst ein Patientenkollektiv von insgesamt 94 Patienten. Diese 94 Patienten entstammen einer Patientenkohorte von 1088 Patienten, welche im Zeitraum zwischen 1992 und 2019 mit einem nicht-metastasierten Primärtumor eines Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle in der Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie der Universität zu Lübeck diagnostiziert wurden. Es wurden lediglich Patienten mit einem primär kurativen Behandlungsansatz, deren Therapie eine operative Tumoresektion des primären Tumors beinhaltete, in die Patientenkohorte aufgenommen. Zusätzlich wurden weitere Parameter wie Alter und Geschlecht der Patienten, Risikofaktoren, Tumoreigenschaften wie die Tumorlokalisierung und das Tumorstadium prospektiv erfasst. Auch der Allgemeinzustand der Patienten wurde anhand des Charlson-Komorbiditätsindex [74] erhoben.

Im Rahmen der Tumornachsorge erfolgte ein 5-Jahres-Follow-up innerhalb der ersten zwei Jahre alle drei Monate, danach alle sechs Monate.

Aufgrund verschiedener Ein- bzw. Ausschlusskriterien wurden insgesamt 994 Patienten aus der ursprünglichen Kohorte von 1088 Patienten ausgeschlossen.

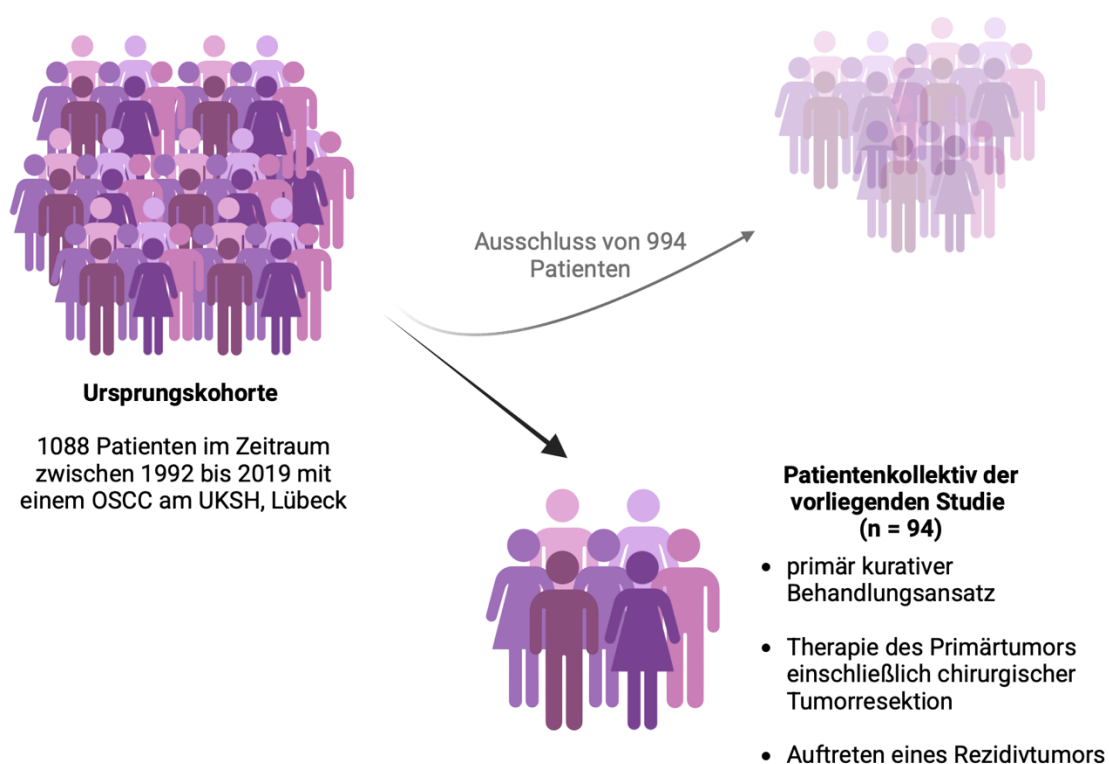
#### 2.1.1 Einschlusskriterien

Eingeschlossen in die vorliegende Studie wurden Patienten, die nach einem Primärtumor eines Plattenepithelkarzinoms in der Mundhöhle auch einen lokoregionären Rezidivtumor entwickelt haben.

#### 2.1.2 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen aus der vorliegenden Studie wurden Patienten, die keine Tumoroperation erhalten haben, da sie entweder vorzeitig verstorben sind, eine Behandlung abgelehnt haben oder primär eine Strahlen- bzw. Chemotherapie erhalten haben ( $n = 945$ ). Außerdem wurden Patienten ausgeschlossen, wenn sie keinen lokoregionären Rezidivtumor aufwiesen ( $n = 815$ ). Ein weiteres Ausschlusskriterium war ein Tumorwachstum, welches nicht von plattenepithelialeem Gewebe ausging ( $n = 131$ ). Auch Patienten mit einer anderen Tumorlokalisierung als der Mundhöhle wie der Oropharynx ( $n = 87$ ) oder mit einem bei

Diagnosestellung bereits vorhandenen Metastasenwachstum ( $n = 41$ ) wurden nicht mit einbezogen.



**Abbildung 4:** Patientenkollektiv der vorliegenden Studie entstehend aus einer Ursprungskohorte ( $n = 1088$ ) und reduziert auf ein Patientenkollektiv von 94 Patienten aufgrund genannter Ein- und Ausschlusskriterien, erstellt mit BioRender.com.

Dabei führten bei einigen Patienten der ursprünglichen Kohorte mehrere Kriterien zum Ausschluss aus der Studie, wodurch sich schlussendlich ein Patientenkollektiv von insgesamt 94 Patienten für die vorliegende Studie ergab.

Zur weiteren Untersuchung wurden innerhalb der klinischen Patientendatenbank-Software (Agfa Orbis®) neben den bereits zuvor genannten weitere detaillierte klinische Daten erfasst. Dazu gehören das Patientenalter bei Diagnosestellung, ein klinisches und pathologisches TNM-Stadium, die Zeit bis zum Auftreten des Rezidiv-Ereignisses und das Gesamtüberleben. Außerdem wurde erfasst, ob eine Strahlen- und bzw. oder Chemotherapie stattgefunden haben. Diese Daten wurden sowohl für den Primärtumor als auch für die Rezidiv-Tumoren erfasst.

## 2.2 Materialgewinnung und immunhistochemische Untersuchung

Im Rahmen dieser Studie wurden von den Patienten der ursprünglichen Patientenkohorte Präparate der Tumorgewebe in Form von chirurgisch resezierten Primär- und Rezidivtumore erstellt. Diese wurden folgend in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach der Paraffineinbettung wurden diese konservierten Gewebelöcke im Archiv der Pathologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck gelagert.

### 2.2.1 Tissue micro array (TMA)

Für die weitere immunhistochemische Auswertung standen uns die Gewebeproben der Primärtumore, der Rezidivtumore und in Fällen des lokoregionären Rezidivs auch von Lymphknotenmetastasen der bereits beschriebenen 94 Patienten zur Verfügung.

Diese Gewebeproben wurden auf sogenannten Tissue-Microarrays (TMAs) zusammengefasst. Auf einem TMA können unterschiedliche Gewebeproben in einem gemeinsamen Paraffinblock zusammen dargestellt und gleichzeitig untersucht werden. Um die TMAs aus den Gewebelöcken zu erstellen, die genau die Regionen mit Tumorgewebe (region of interest, ROI) enthalten, wurden Objektträger der verschiedenen Gewebeproben mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) für eine erste Beurteilung herangezogen.

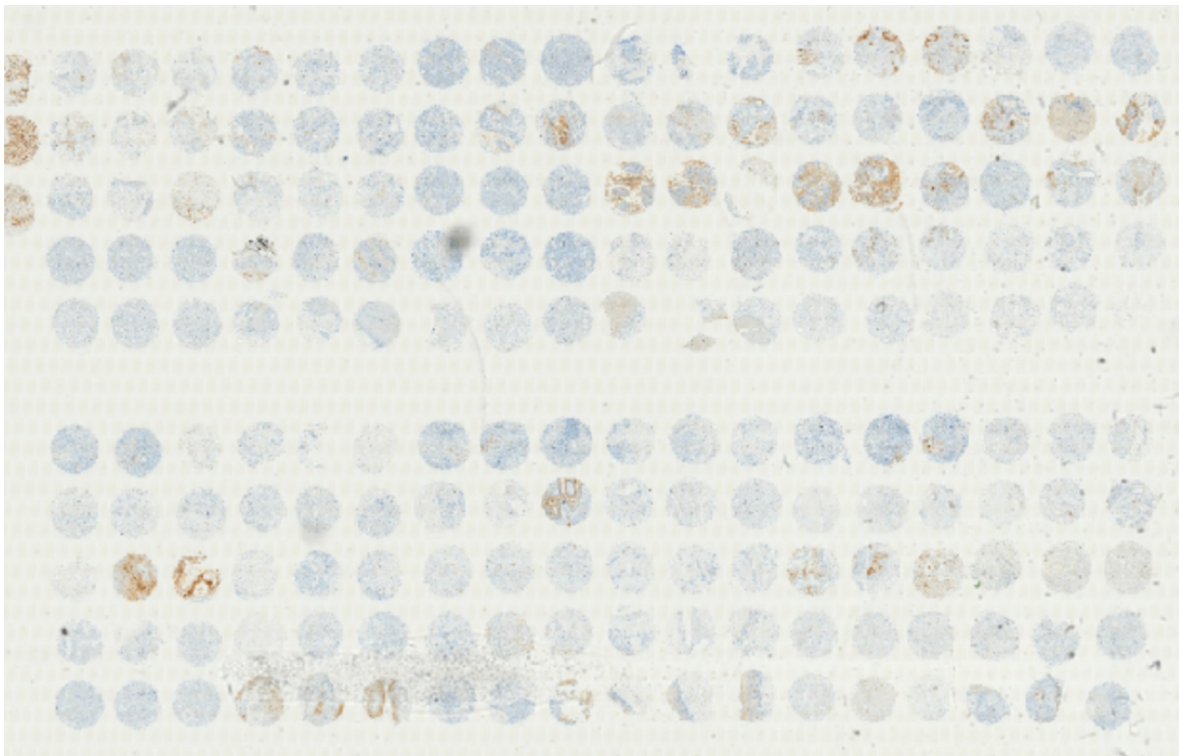
Mit Hilfe dieser HE-Objektträger wurden die ROIs markiert und die Paraffinblöcke angepasst. In einem weiteren Schritt konnten aus diesen markierten Bereichen Proben mit einem Durchmesser von ca. 1 mm ausgestanzt werden, welche daraufhin in Paraffin-Empfängerblöcke eingebettet wurden.

Insgesamt sind dabei drei verschiedene Bereiche je Tumorprobe ausgestanzt worden. Diese Stanzen sind folgend als sogenannte TMA-Cores zu einem TMA angeordnet worden, wie beispielhaft in Abbildung 5 dargestellt.

Jedes TMA enthielt bis zu 180 Tumorproben in Form von je drei zusammengehörigen Cores je Tumorprobe. Alle Cores hatten einen Durchmesser von ca. 1mm.

Mithilfe vorab angefertigter Excel-Übersichten wie in Abbildung 6 konnte im Rahmen der anschließenden Auswertung der vielen Tumorproben innerhalb eines TMAs die richtige Zuordnung jeder Probe sichergestellt werden.

Aussortiert wurden Cores, die kein Tumorgewebe, Färbungsartefakte oder Gewebefalten enthielten. Aus den erstellten TMA-Empfängerblöcken wurden 3 µm dünne Scheiben geschnitten und auf einen Glas-Objektträger aufgebracht. Hier wurden alle weiteren immunhistochemischen Reaktionen auf einem Ventana BenchMark automatisierten Färbesystem (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt [75].



**Abbildung 6:** Tissue micro array (TMA) mit einzelnen TMA-Cores am Beispiel der Tumorrezidivproben von SERPIN-B2

Kontrolle	1	1	1	2	2	2	11	11	11	12	12	12	21	21	21	22	22	22
Kontrolle	3	3	3	4	4	4	13	13	13	14	14	14	23	23	23	24	24	24
Kontrolle	5	5	5	6	6	6	15	15	15	16	16	16	25	25	25	26	26	26
	7	7	7	8	8	8	17	17	17	18	18	18	27	27	27	28	28	28
	9	9	9	10	10	10	19	19	19	20	20	20	29	29	29	30	30	30
	31	31	31	32	32	32	41	41	41	42	42	42	51	51	51	52	52	52
	33	33	33	34	34	34	43	43	43	44	44	44	53	53	53	54	54	54
	35	35	35	36	36	36	45	45	45	46	46	46	55	55	55	56	56	56
	37	37	37	38	38	38	47	47	47	48	48	48	57	57	57	58	58	58
	39	39	39	40	40	40	49	49	49	50	50	50	59	59	59	60	60	60

**Abbildung 5:** Excel-Tabellen Übersicht zur Identifikation der einzelnen Proben des TMA-Derrayers

## 2.2.2 Immunhistochemische Methode

In der vorliegenden Studie wurden die Proteine SERPIN B2, Ki-67 sowie EGFR untersucht. Zur Detektion der Expression dieser Proteine wurde für jedes eine individuelle Färbereaktion angewandt, welche auch unterschiedliche Positivkontrollen enthielt. Die genauen Angaben hierzu stellt Tabelle 5 dar.

**Tabelle 5:** Angaben zu Färbungen der verschiedenen untersuchten Proteine

<b>Antikörper</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>	<b>Firma</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Positivkontrolle</b>
<b>anti-EGFR</b>	Rabbit mono-clonal	5B7	Ventana/Roche	ca. 0,4µg/ml	Tonsille
<b>anti-Serpin-B2</b>	Rabbit mono-clonal	EPR22924-56	Abcam	ca. 0,121µg/ml	Tonsille
<b>anti-Ki-67</b>	Rabbit mono-clonal	30-9	Ventana/Roche	ca. 2µg/ml	Tonsille

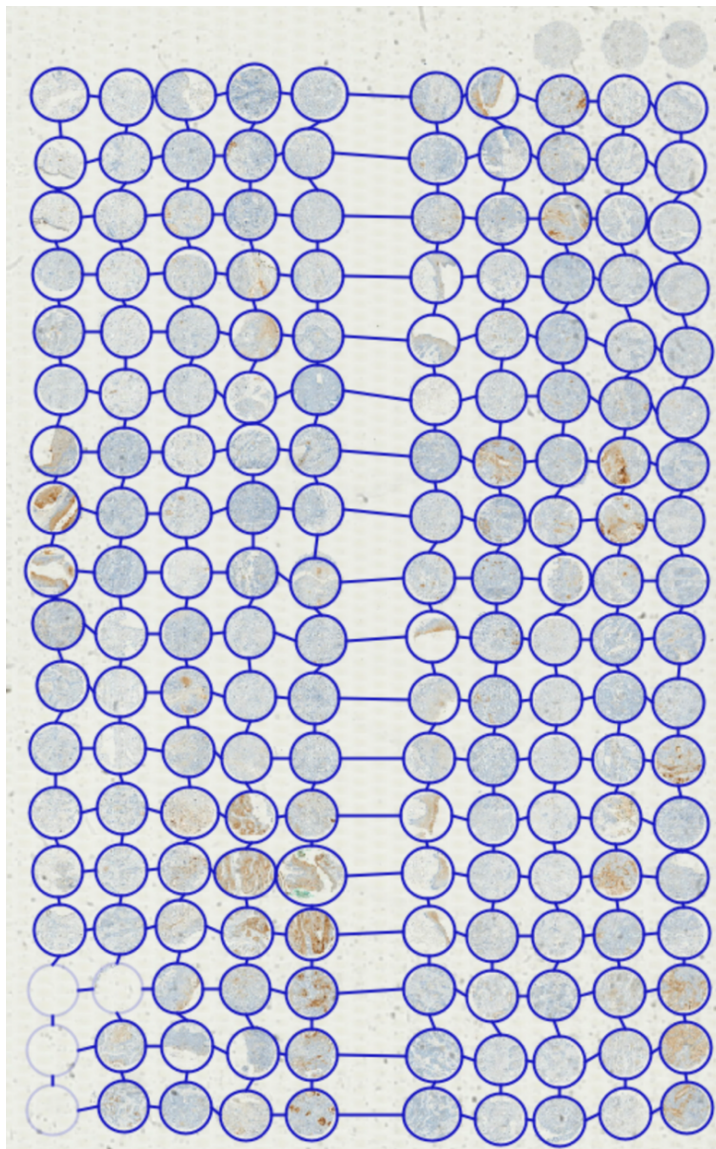
## 2.2.3 QuPath

Für die digitale Auswertung der oben beschriebenen TMAs wurde die Bildanalysesoftware QuPath verwendet. QuPath ist eine Open-Source-Software für Biobildanalysen in der digitalen Pathologie zur Analyse von Objektträgern. Insbesondere durch die Möglichkeit der Anfertigung spezifischer Auswertungs-Algorithmen ist eine strukturierte Analyse komplexer Gewebebilder wie bspw. von Tumorgewebe auch in großer Zahl möglich [76].

Für die Auswertung in QuPath wurden die oben beschriebenen TMAs als TIF- und teilweise auch als BIF-Dateien genutzt. Die Analyse wurde auf einem Apple MacBookAir 2020, M1 Chip, 16 GB RAM und 13,3“ Retina Display mit nativer Auflösung von 2560 x 1600 Pixel bei 227 ppi durchgeführt.

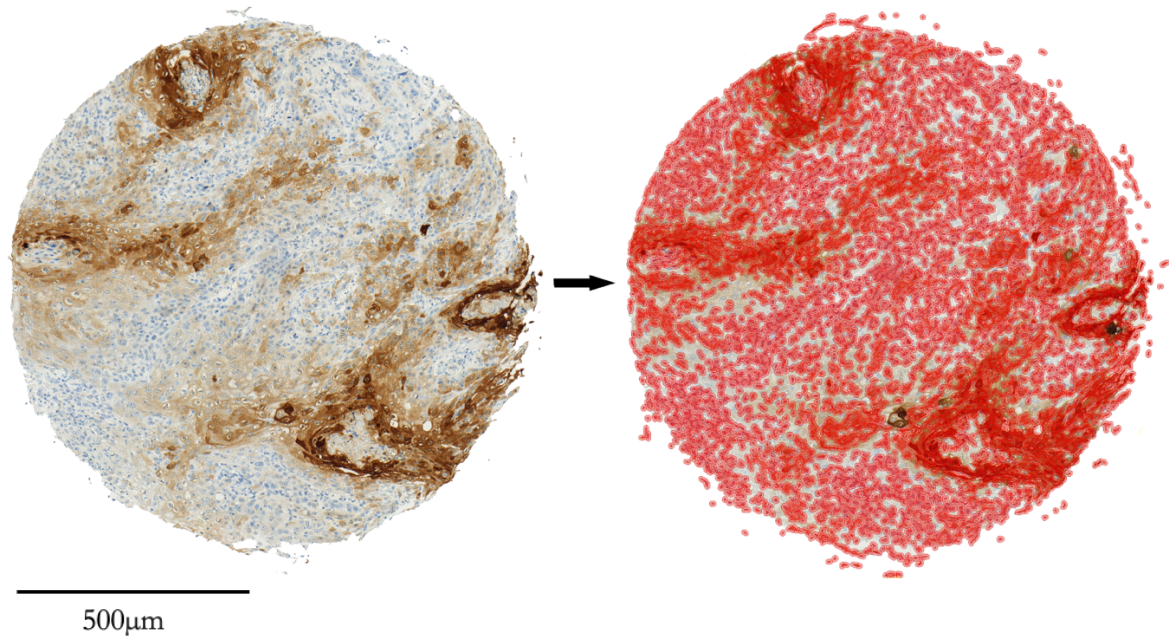
## Durchführung

1. Für jedes Markerprotein wurde in QuPath ein Projekt erstellt. Diesem Projekt wurden alle Bilddateien hinzugefügt, welche die TMAs der Primärtumorproben, der Rezidivtumorproben und der Lymphknoten-Metastasen beinhalteten.
2. Im nächsten Schritt wurde auf die insgesamt 5 TMAs pro Markerprotein das „TMA-derrayer feature“ angewandt. Hierdurch wurde ein Raster angelegt, in welchem jedes Core einzeln angewählt und im Nachgang analysiert werden konnte (Abb.7).



**Abbildung 7:** TMA-Derrayer nun mithilfe der Analyse-Software Qupath zur Auswertung in ein Raster gelegt

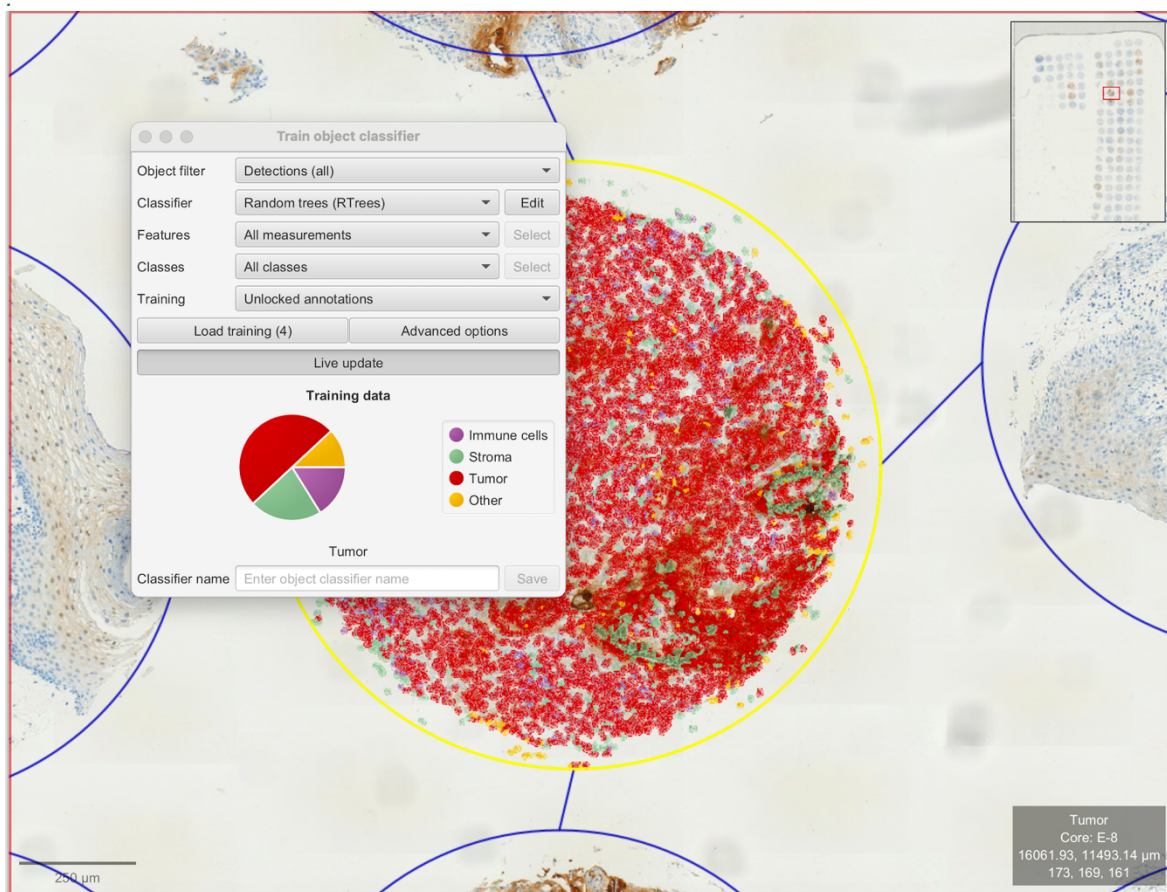
3. Als Nächstes wurden alle Cores eines TMAs angewählt und das „cell detection feature“ angewandt. Das Programm detektierte jede einzelne Zelle je Core. Hierfür konnten vorab weitere Parameter wie bspw. die Hintergrundintensität angepasst werden. In der vorliegenden Studie wurden die Standard-Parameter beibehalten (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Feature Cell Detection durchgeführt an einem beispielhaften Core eines SERPIN B2 TMAs. Das linke Bild zeigt die unbearbeitete Tumorprobe, das rechte Bild zeigt die detektierten Zellen, welche bisher nicht weiter klassifiziert wurden.

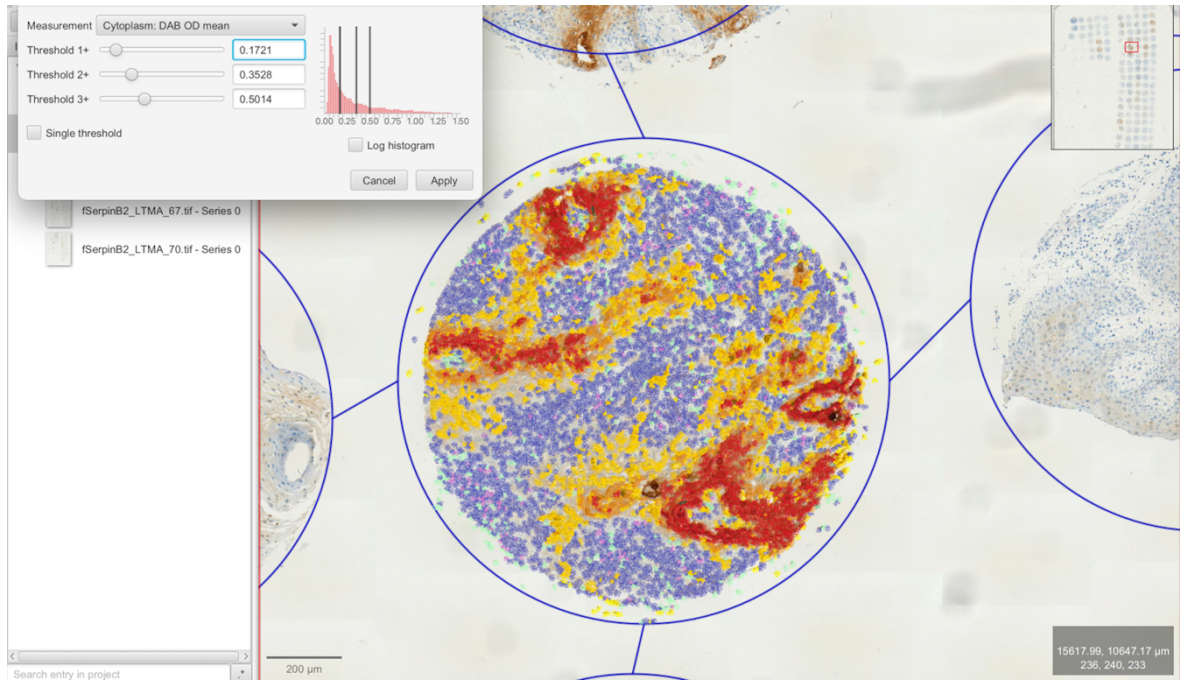
In den folgenden Schritten erfolgte die individuelle Arbeit je Protein.

4. Je Protein wurden sogenannte „annotations“ erstellt. Es wurden Bereiche markiert, die entweder lediglich Tumorzellen, Immunzellen, Stromazellen oder ggf. anderes Gewebe oder Artefakte - genannt „others“ - enthielten. Diese Markierungen konnten als sogenannter „object classifier“ auf das gesamte Projekt angewandt werden und das Programm errechnete ein Verhältnis der vorliegenden Zellgewebe (Abb. 9).

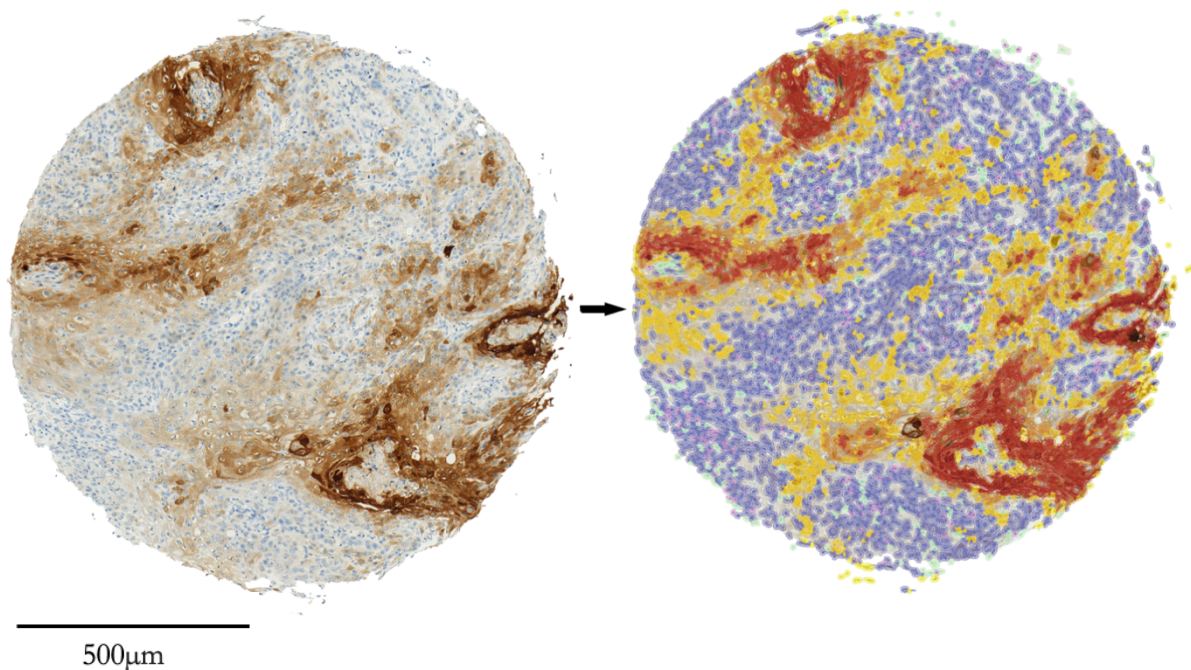


**Abbildung 9:** Das Core aus der Abbildung zuvor wurde nun mithilfe der erstellten „Annotations“ hinsichtlich seiner Zellgewebe ausgewertet und zeigt zum größten Teil Tumorzellen.

5. Dann wurde die sogenannte „cell intensity classification“ bearbeitet. Hier wurden Parameter der Färbeintensität festgelegt. So konnte das Programm zwischen positiv und negativ gefärbten Zellen unterscheiden (Abb. 10).
6. In einem letzten Schritt wurde aus „object classifier“ und „cell intensity classification“ ein Skript erstellt. Dieses wurde auf alle TMAs je Markerprotein angewandt. So konnte jedes Core von QuPath anhand des Skriptes nach vorgegebenem Standard ausgewertet werden. Die nachfolgende Abbildung 11 zeigt eine finale Auswertung.



**Abbildung 10:** Bearbeitung der Färbeintensität eines Cores in QuPath mit Hilfe der sogenannten "Cell intensity classification". Blau bedeutet, die Zellen haben keine immunhistochemische Reaktion gezeigt, gelb über orange bis rot zeigen aufsteigende Färbeintensität im Sinne einer immunhistochemischen Reaktion. Weiterhin erkennt man in grün gefärbt Stromazellen und in lila gefärbte Immunzellen.



**Abbildung 11:** Vor vs. Nach der Auswertung des exemplarischen TMA-Cores von SERPIN B2. Links zeigt das Core vor Auswertung, rechts zeigt die finale Auswertung in QuPath mit der Unterscheidung in Tumorgewebe (blau, gelb, orange und rot) und andere (bspw. Stromazellen in grün), sowie Zellen mit immunhistochemischer Reaktion oder ohne (blau).

## 2.2.4 Interpretation der immunhistochemischen Färbung

Am Ende der oben beschriebenen Bearbeitungsschritte errechnete QuPath auf Grundlage der vorgegebenen Parameter separate Ergebnisse für jedes Core. Für jede vorher festgelegte Zellkategorie – also Tumorzellen, Immunzellen und Stromazellen – wurde der prozentuale Anteil der Zellen mit einer immunhistochemischen Reaktion angegeben. Als positiv, also mit vorhandener Expression des jeweiligen Proteins werteten wir ein Core, wenn es einen bestimmten Cutoff-Wert an immunhistochemischer Reaktion in Tumorzellen überschritt. Dieser Wert wurde je Markerprotein individuell errechnet. Wir entschieden uns, hierfür den H-Score als Maß zu nutzen anstelle einer rein prozentualen Auswertung. Der H-Score ist ein häufig genutzter Endpunkt zur Beurteilung immunhistochemischer Untersuchungen. Er errechnet sich mithilfe eines vorgegebenen Algorithmus aus dem Verhältnis positiv gefärbter Tumorzellen zur Gesamtzahl der erkannten Tumorzellen, wobei die positiv gefärbten Zellen auch in unterschiedliche Färbeintensitäten unterteilt und gewichtet werden. Somit erfasst der H-Score neben dem Anteil auch die Färbeintensität des untersuchten Biomarkers. Er umfasst Werte zwischen 0 und 300 [77]. Konkret ergab sich je Markerprotein ein Wert zwischen 0 und 300 durch Addition des Prozentsatzes der stark gefärbten Zellen (gewichtet mit 3), des Prozentsatzes der mäßig gefärbten Zellen (gewichtet mit 2) und des Prozentsatzes der schwach gefärbten Zellen (gewichtet mit 1). Weitere Informationen für die genaue Berechnung dieser Cutoff-Grenzwerte wird im folgenden Abschnitt über die statistische Auswertung näher beschrieben.

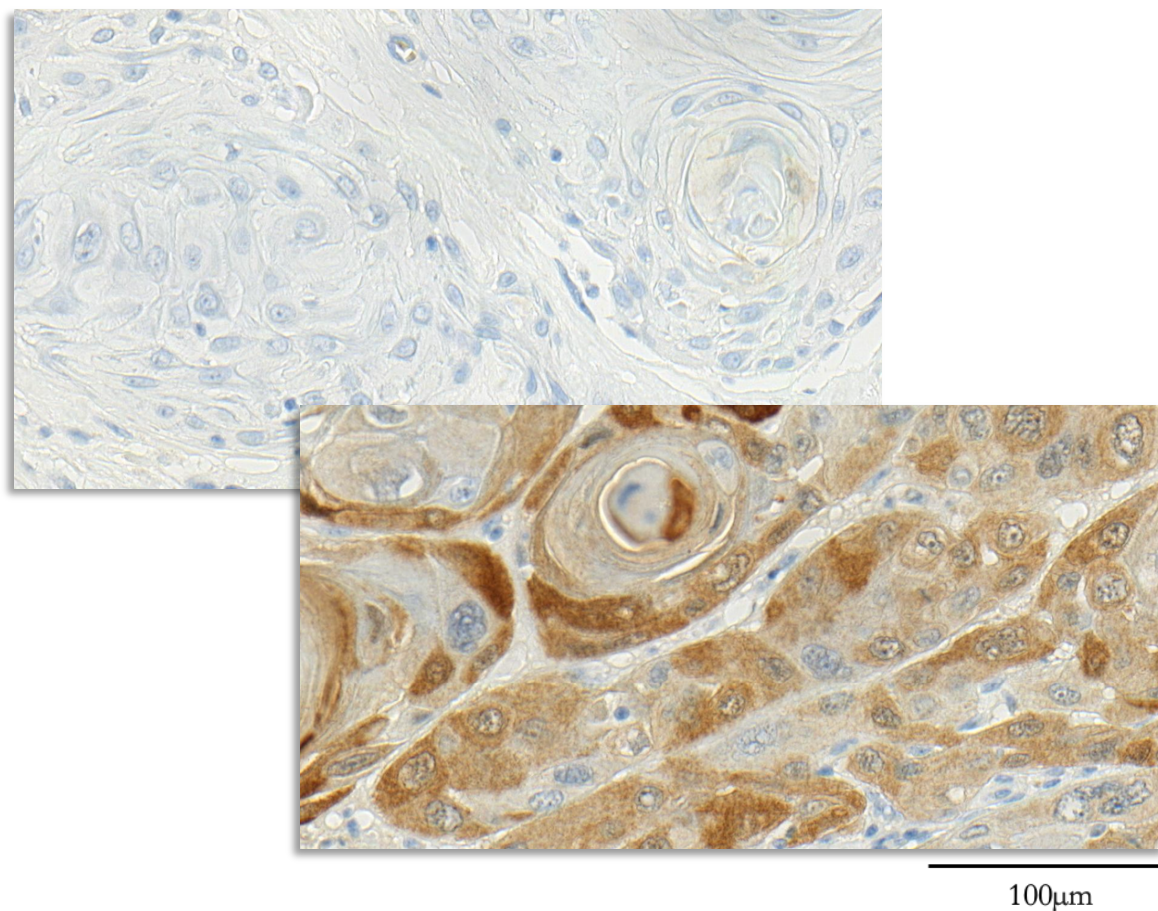
Die Bewertung der immunhistochemischen Reaktion von SERPIN B2 erfolgte dann als positiv, wenn eine zytoplasmatische Färbung in epithelialen Tumorzellen beobachtet wurde. Positiv- sowie Negativbeispiele hierfür sind in Abbildung 12 dargestellt. Auf dieser Grundlage ergab sich als Cutoff ein H-Score von 11.

Bei der immunhistochemischen Reaktion zwischen Ki-67 und dem gewählten Antikörper zur Detektion wurde eine nukleäre Färbung in Tumorzellen als positiv bewertet. Der H-Score konnte auf dieser Grundlage für 117 festgelegt werden. Die Abbildung 13 stellt stark gefärbte und wenig gefärbte Bereiche dar.

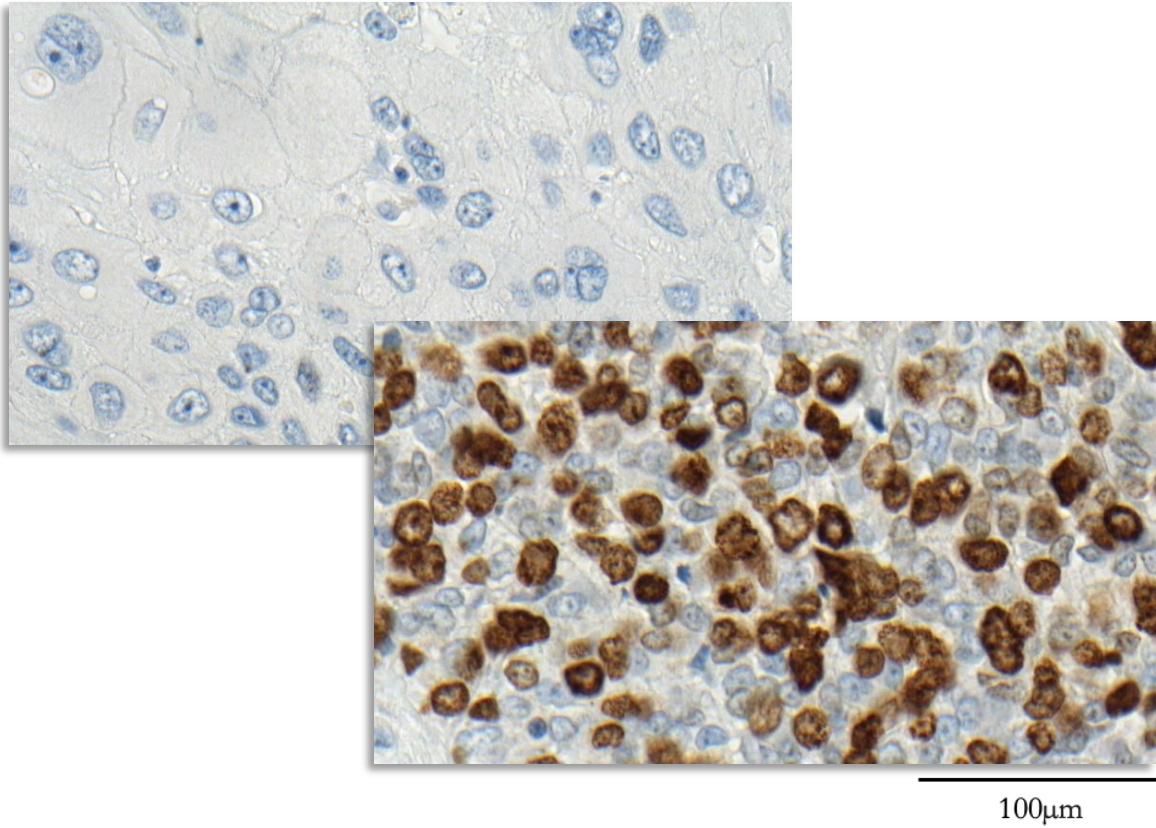
Die immunhistochemische Reaktion von EGFR zeigte das gefärbte Korrelat sowohl im Zytoplasma als auch der Zellmembran (siehe Abb.13). Der Cutoff-Wert für EGFR wurde bei einem H-Score von 91 festgelegt.

Sobald eine Probe einen H-Score aufwies, welcher größer oder gleich der genannten Grenzwerte war, zählte diese Gewebeprobe in die Gruppe SERPIN B2 bzw. Ki-67 bzw. EGFR

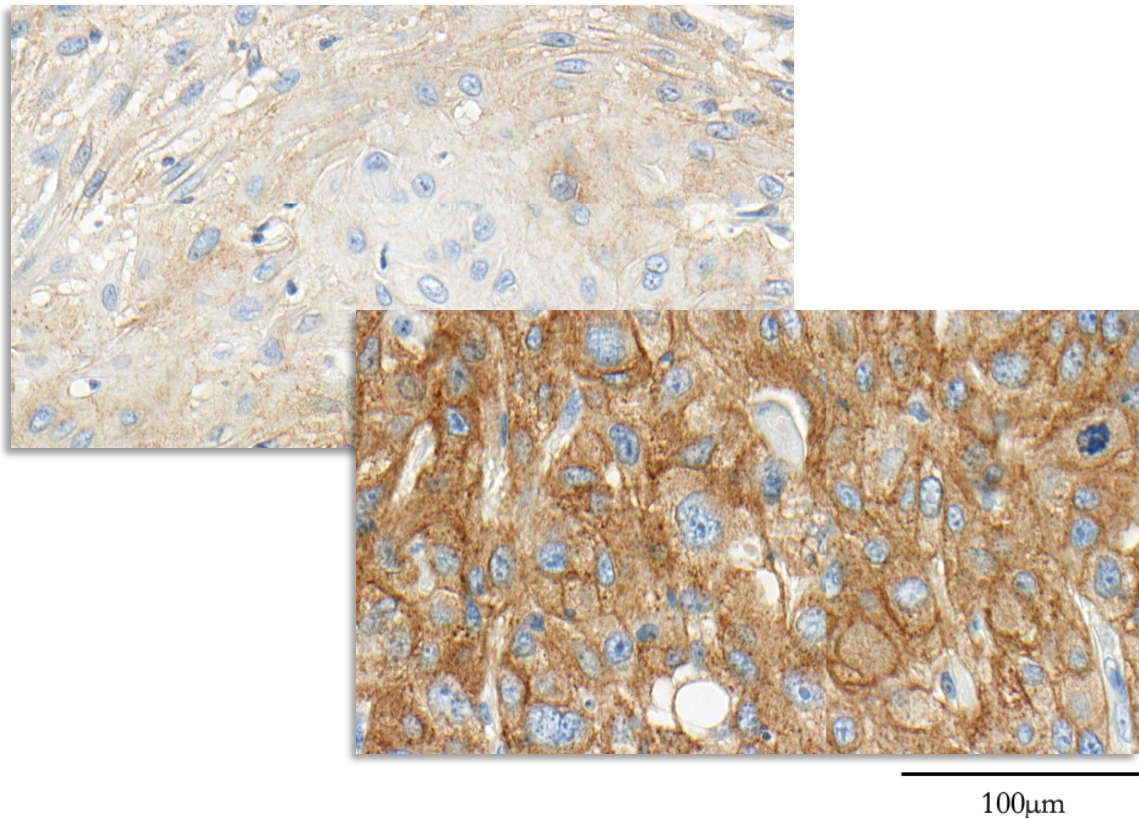
exprimierenden Tumorgewebes. Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits beschrieben untersuchten wir lediglich die Tumorzellen. Färbereaktionen in bspw. Immunzellen wurden in unserer Studie nicht beachtet.



**Abbildung 12:** Geringe Expression (links) vs. starke Expression (rechts) von SERPIN B2 in immunohistochemisch untersuchten Tumorgewebeproben



**Abbildung 13:** Geringe Expression (links) vs. starke Expression (rechts) von Ki-67 in immunohistochemisch untersuchten Tumorgewebebeobachten



**Abbildung 14:** Geringe Expression (links) vs. starke Expression (rechts) von EGFR in immunohistochemisch untersuchten Tumorgewebebeobachten

## 2.3 Statistische Auswertung

Die deskriptiven Statistiken wurden anhand von Häufigkeiten, Prozentsätzen, Medianen und Spannen zusammengefasst. Kontinuierliche Daten werden als Mittelwert (SD) und Mediane mit Interquartilsabstand (IQR) dargestellt.

Die Überlebensanalysen wurden sowohl uni- als auch multivariat ausgewertet. Die Kaplan-Meier-Methode wurde für die Schätzung der Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens (pr DFS) und des Gesamtüberlebens (pr OS) verwendet. Die univariate Analyse wurde durch den Vergleich der Gruppen mit dem Log-Rank-Test durchgeführt. Die Schönfeld-Residuen wurden aufgetragen, um die Proportionalitätsannahme zu überprüfen.

Für jede Methode zur Schätzung des Cutoff-Punktes generiert die Anwendung ein Histogramm, ein Kaplan-Meier-Diagramm und berechnet das Hazard Ratio, Konfidenzintervalle und p-Werte. Die Schätzung der Cutoff-Punkte erfolgte mit Hilfe des Pakets "rolr", das für die Suche nach optimalen Zwei-Gruppen-Splits auf der Grundlage eines Überlebensergebnisses verwendet wird (Funktion "rhier"). Es wurden Median-Cutoff-Punkte verwendet.

Kaplan-Meier-Diagramme wurden mit einer Kombination der Pakete "survival", "survminer", "ggplot2" und "plotly" erstellt. Das Gefährdungsverhältnis, die Konfidenzintervalle und die p-Werte wurden mit der Funktion "coxph" aus dem Survival-Paket geschätzt.

Alle Tests waren 2-teilig und die Signifikanz wurde auf  $p < 0,05$  gesetzt. Alle Schätzungen wurden mit 95% Konfidenzintervallen (CI) angegeben. Alle Analysen wurden mit dem R Core Team (2023) durchgeführt.

## 2.4 Ethik

Bei Aufnahme in die Studie unterzeichneten alle Teilnehmer eine Einverständniserklärung. Sie erklärten sich mit Erfassung und anonymen Verarbeitung ihrer Daten für die wissenschaftliche Forschung einverstanden. Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (ID: 12-079A).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv umfasste wie bereits dargelegt insgesamt 94 Patienten, welche zwischen 1992 und 2019 mit einem nicht-metastasierten Primärtumor eines Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle in der Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie der Universität zu Lübeck diagnostiziert wurden und die weiteren in Kapitel 2.1.1 genannten Einschlusskriterien erfüllten. Tabelle 6 stellt weitere demografische und klinische Merkmale des untersuchten Patientenkollektivs dar.

**Tabelle 6:** Demografische und klinische Merkmale des vorliegenden Patientenkollektivs

Variable	N = 94
Alter (in Jahren)	62 (52, 71) <sup>1</sup>
Geschlecht	
Weiblich	30 (32%)
Männlich	64 (68%)
CCI	
0	59 (63%)
1 ≤	34 (37%)
Unbekannt	1
Rauchen	
Ehemals oder aktiv	69 (78%)
Nie	20 (22%)
Unbekannt	5
Alkoholkonsum	
Exzessiv	52 (60%)
Nie oder moderat	35 (40%)
Unbekannt	7
Tumor Staging	
rT1	24 (26%)
rT2	16 (18%)
rT3	10 (11%)
rT4	28 (31%)

Variable	N = 94
rTx	13 (14%)
Unbekannt	3
Lymphknoten Staging	
rN+/x	63 (68%)
rN0	29 (32%)
Unbekannt	2
Lokalisation des Rezidivtumors	
Anteriore Zunge	11 (12%)
Wange/ Vestibulum/ Retromolar	13 (14%)
Mundboden	39 (41%)
Lippe	2 (2.1%)
Lokoregionäre Lymphknoten	15 (16%)
Oropharynx	11 (12%)
Gaumen	3 (3.2%)
Patienten mit Eintreten eines Ereignisses	76 (81%)
Tod	67 (71%)

<sup>1</sup>Median (IQR); n (%)

Das mediane Alter der untersuchten Patientenkohorte lag bei 62 Jahren, mit einem Interquartilsabstand von 52 bis 71 Jahren.

32% der Patienten waren weiblich, 68% männlich. Die Auswertung des Charlson-Komorbiditätsindex ergab bei 59 (63%) Patienten einen Wert von 0, bei 34 (37%) der Patienten einen Wert von mindestens 1. Der größere Teil der Kohorte wies demnach keine erheblichen Komorbiditäten vor.

Eine Auswertung der häufigsten Risikofaktoren zeigte, dass 69 (78%) Patienten aktive oder ehemalige Raucher waren. 20 (22%) Patienten hatten nie geraucht, bei 5 Patienten gab es keine Angabe zum Raucherstatus. 52 (60%) Patienten betrieben einen exzessiven Alkoholkonsum, 35 (38%) Patienten beschrieben einen moderaten oder enthaltsamen Alkoholkonsum bzw. hatten nie getrunken. Bei 7 Patienten fehlte eine Angabe zum Alkoholkonsum.

Weiterhin gab es unterschiedliche den Tumor beschreibende Daten im Rahmen des TNM-

Stadiums. 24 (26%) Patienten wiesen eine TumorgroÙe im rT1-Stadium, 16 (18%) im rT2-Stadium, 10 (11%) im rT3 Stadium und 28 (31%) im rT4-Stadium vor. Bei 13 (14%) Patienten war die TumorgroÙe nicht ausreichend beurteilbar und bei 3 Patienten unbekannt. Insgesamt 63 (68%) Patienten hatten mindestens eine Lymphknotenmetastase.

In der vorliegenden Studie beschäuftigten wir uns mit dem Rezidivverhalten von Mundhöhlenkarzinomen. Die Lokalisation des Rezidivtumors war in den meisten Fällen, also bei 39 (41%) Patienten im Mundboden zu finden, gefolgt von 15 (16%) Patienten mit Rezidiv in lokoregionären Lymphknoten, bei 13 (14%) Patienten in Wange, Vestibulum oder der Retromolarregion, bei 11 (12%) Patienten im Bereich der anterioren Zunge oder des Oropharynx, bei 3 (3,2%) Patienten im Gaumen und nur bei 2 (2,1%) Patienten im Bereich der Lippen.

Insgesamt hatten 76 (81%) Patienten bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes ein Eintreten eines der untersuchten Endpunkte (Tod, 2. Rezidiv). 67 (71%) Patienten verstarben bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes.

### 3.2 Ergebnisse der Untersuchung von SERPIN B2

In der hier zugrundeliegenden Studie erfolgte die Nachuntersuchung der Patienten innerhalb der 5-Jahres-Tumornachsorge. Als Endpunkte wurde das Eintreten eines Rezidivs oder der Tod festgelegt. Wir untersuchten das Gesamtüberleben nach dem Auftreten des ersten Rezidivs.

Tabelle 7 zeigt eine deskriptive Analyse des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens und des post-Rezidiv Überlebens mit SERPIN B2- Über- und Unterexpression. Die Festlegung des Grenzwertes der Markerexpression erfolgte mit Hilfe des H-Scores von 11.

Insgesamt verstarben von 94 Patienten 67 (71%) innerhalb des Untersuchungszeitraumes. Von diesen 67 verstorbenen Patienten zählten 27 (59%) in die Gruppe der SERPIN B2-überexprimierenden Tumoren (H-Score  $\geq$  11). Hingegen zählten 40 (83%) Patienten zählten in die Gruppe der SERPIN B2-unterexprimierenden Tumoren (H-Score  $<$  11).

Weiterhin differenzierten wir die Todesursache nach einem krebsspezifischen Sterben und dem Tod anderer Ursache. Von 67 Patienten verstarben 57 infolge der untersuchten Krebserkrankung. Hiervon zählten 27 (59%) in die SERPIN B2-überexprimierende Gruppe, 30 (63%) in die SERPIN B2-unterexprimierende Gruppe. 10 (11%) Patienten verstarben an anderer Ursache. All diese Patienten zählten in die SERPIN B2-unterexprimierende Gruppe.

Von den 94 Patienten der Studienkohorte entwickelten 31 (33%) ein zweites Rezidiv. Hiervon zählten 18 (39%) Patienten in die SERPIN B2-überexprimierende Gruppe und 13 (27%) in die SERPIN B2-unterexprimierende Gruppe.

Insgesamt gelten 18 (19%) Patienten als zensiert, da keiner der festgelegten Endpunkte eintrat.

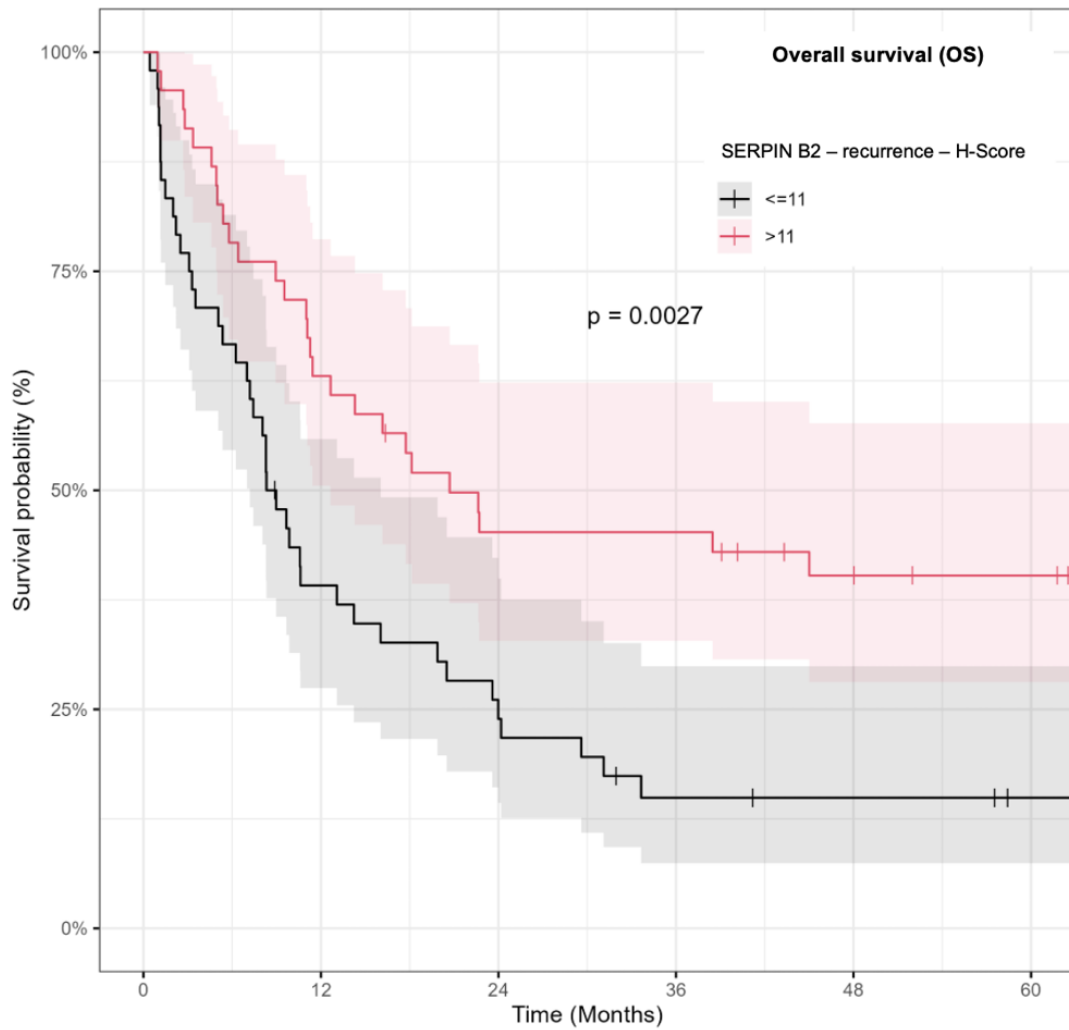
**Tabelle 7:** Deskriptive Analyse des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens, sowie des post-Rezidiv-Überlebens mit SERPIN B2 Über- und Unterexpression

Rezidivtumor	Variable	Gesamt, N = 94	SERPIN-B2 H-Score	
			<=11, N = 48	>11, N = 46
Tod gesamt				
	Lebend oder zensiert	27 (29%)	8 (17%)	19 (41%)
	Tod	67 (71%)	40 (83%)	27 (59%)
Todesursache				
	Lebend oder zensiert	27 (29%)	8 (17%)	19 (41%)
	Tod infolge der Krebserkrankung	57 (61%)	30 (63%)	27 (59%)
	Tod anderer Ursache	10 (11%)	10 (21%)	0 (0%)
Krankheitsfreies Überleben nach dem 1. Rezidiv				
	Zensiert	18 (19%)	5 (10%)	13 (28%)
	Tod infolge der Krebserkrankung	36 (38%)	21 (44%)	15 (33%)
	Tod anderer Ursache	9 (9.6%)	9 (19%)	0 (0%)
	Lokoregionäres Rezidiv	31 (33%)	13 (27%)	18 (39%)

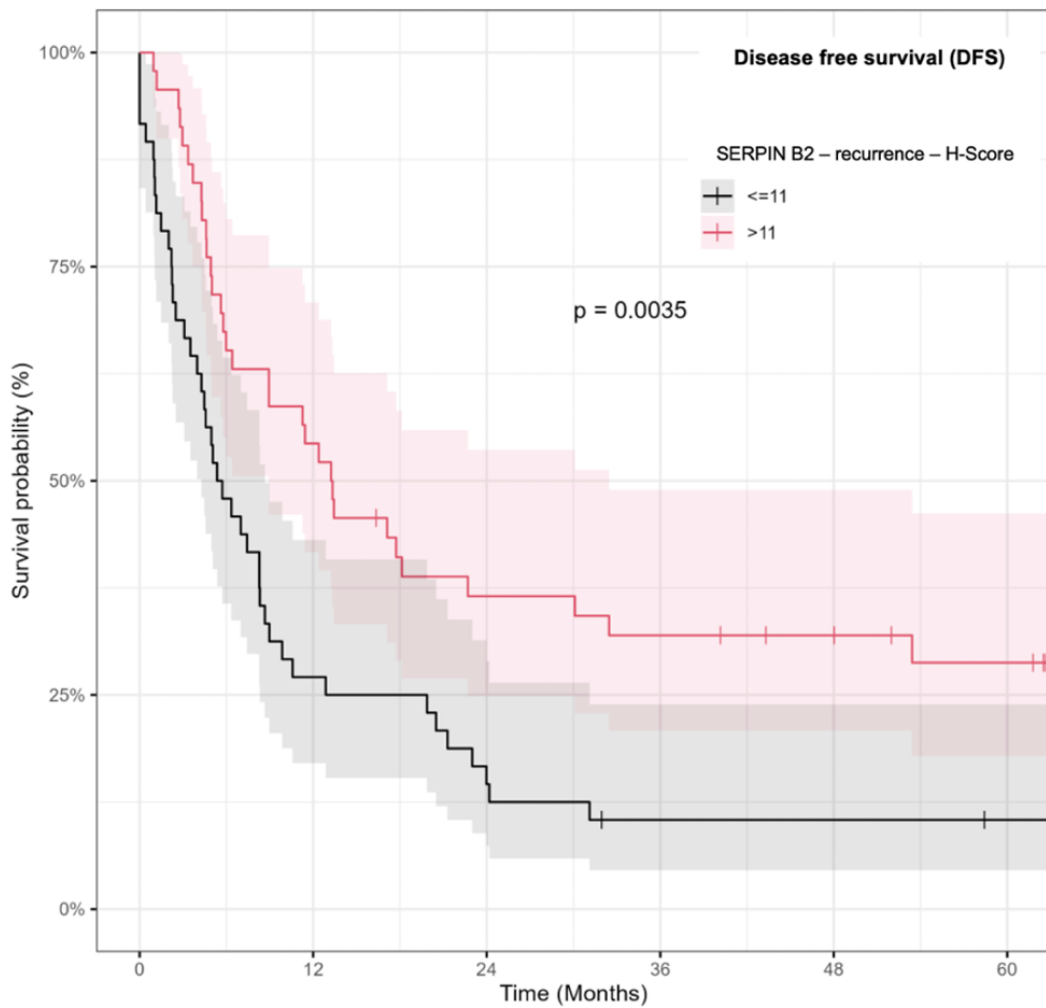
### 3.2.1 Überlebensanalyse nach dem Rezidiv

Um zu beurteilen, ob sich das Gesamtüberleben nach Rezidiv eines OSCC unterscheidet, je nachdem ob eine SERPIN B2-Expression innerhalb der festgelegten Grenzwerte vorlag oder nicht, führten wir eine Analyse nach dem Kaplan-Meier Verfahren durch.

Abbildung 15 stellt dies graphisch dar. So konnten wir zeigen, dass Patienten mit einer Expression von SERPIN B2 oberhalb des festgelegten Grenzwertes (H-Score  $\geq 11$ ) im Vergleich zur Gruppe derer mit Expression von SERPIN B2 unter dem Grenzwert (H-Score  $< 11$ ) ein signifikant besseres post-Rezidiv-Überleben innerhalb des Untersuchungszeitraumes zeigten ( $p = 0,0027$ ). Auch zeigten Patienten mit einer erhöhten SERPIN B2 Expression ein signifikant verbessertes post-Rezidiv-krankheitsfreies Überleben ( $p = 0,0035$ ) wie Abbildung 16 darstellt.



**Abbildung 15:** Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens (OS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von SERPIN B2



**Abbildung 16:** Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-krankheitsfreien Überlebens (DFS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von SERPIN B2

### 3.2.2 Multivariate Analyse

Zusätzlich zu der bereits beschriebenen univariaten Analyse im Rahmen des Kaplan-Meier Verfahrens war auch der potenzielle Einfluss weiterer Variablen (Alter, CCI-Score, Tumorgröße, Lymphknotenstatus) auf das Gesamtüberleben von Interesse.

Wir führten eine multivariate Analyse nach dem Cox-Regressionsmodell durch. Hierdurch konnte jeweils der Einfluss einer einzelnen Variable auf das post-Rezidiv-Gesamtüberleben beurteilt werden, während gleichzeitig der Einfluss anderer Variablen berücksichtigt wurde.

Diese Analyse erfolgte in Hinblick auf das post-Rezidiv-Gesamtüberleben (OS) und auch auf das post-Rezidiv-krankheitsfreie Überleben (DFS).

Tabelle 8 zeigt nun, dass das post-Rezidiv-Überleben innerhalb der Gruppe der SERPIN B2-überexprimierenden Tumoren unter Berücksichtigung der genannten weiteren Variablen nicht signifikant unterschiedlich ist. Die Patienten der SERPIN-B2-überexprimierenden Gruppe zeigten weder ein signifikant verändertes post-Rezidiv-Gesamtüberleben ( $HR_{OS} = 0,61$ ;  $p_{OS} = 0,075$ ), noch ein signifikant verändertes post-Rezidiv-krankheitsfreies Überleben ( $HR_{DFS} = 0,65$ ;  $p_{DFS} = 0,1$ ).

Die Sterberate von Patienten mit einem großen Tumor (rT4) war im Vergleich zu denjenigen mit einem kleinen Tumor (rT1) 3,84fach so hoch und damit um 284% höher ( $HR = 3,84$ ;  $p = 0,001$ ). Auch hatten diese Patienten ein signifikant schlechteres post-Rezidiv-krankheitsfreies Überleben ( $HR = 2,71$ ;  $p = 0,005$ ).

Patienten mit dem Vorliegen von Komorbiditäten, bemessen anhand eines Charlson-Komorbiditätsindex von größer 1, zeigten ebenso keinen signifikanten Unterschied in post-Rezidiv-Gesamtüberleben und -krankheitsfreiem Überleben.

Sowohl das Sterberisiko als auch das Risiko des Eintretens eines Rezidivs zeigten bei steigendem Patientenalter bei Erstdiagnose keinen signifikanten Unterschied ( $HR_{OS} = 1$ ;  $p_{OS} = 0,5$ ;  $HR_{DFS} = 1,01$ ;  $p_{DFS} = 0,2$ ).

**Tabelle 8:** Multivariate Analyse - Einfluss verschiedener Variablen und SERPIN B2 auf das Gesamtüberleben (OS) und das krankheitsfreie Überleben (DFS) nach Rezidiv eines OSCC. Signifikante Werte sind fett markiert.

Rezidiv	OS			DFS		
	HR <sup>1</sup>	95%CI <sup>2</sup>	p-Wert	HR <sup>1</sup>	95%CI <sup>2</sup>	p-Wert
Alter	1	0.99, 1.01	0.5	1.01	1.00, 1.02	0.2
CCI-Score						
0	-	-		—	—	
1 ≤	1.13	0.64, 2.01	0.7	1.37	0.80, 2.36	0.3
T-Stadium						
rT1	-	-		—	—	
rT2	3.97	1.55, 10.2	<b>0.004</b>	3.64	1.58, 8.37	<b>0.002</b>
rT3	5.62	2.04, 1	<b>&lt;0.001</b>	2.97	1.19, 7.40	<b>0.019</b>
rT4	3.84	1.72, 8.58	<b>0.001</b>	2.71	1.35, 5.44	<b>0.005</b>
rTx	2.37	0.94, 5.98	<b>0.069</b>	2.27	0.99, 5.24	0.054
N-Stadium						
rN0	—	—		—	—	
rN+/x	2.88	1.51, 5.50	<b>0.001</b>	1.84	1.04, 3.28	<b>0.038</b>
SERPIN B2 H-Score						
≤11	—	—		—	—	
>11	0.61	0.36, 1.05	<b>0.075</b>	0.65	0.39, 1.09	0.1

HR<sup>1</sup> = Hazard Ratio, CI<sup>2</sup> = Confidence Interval

### 3.3 Ergebnisse der Untersuchung von Ki-67

Ebenso wie für SERPIN B2 untersuchten wir den Einfluss der Expression von Ki-67 auf das post-Rezidiv-Gesamtüberleben von Patienten mit einem Rezidivtumor eines Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle.

Der H-Score zur Bestimmung des Grenzwertes der Ki-67-Expression wurde auf 117 festgelegt.

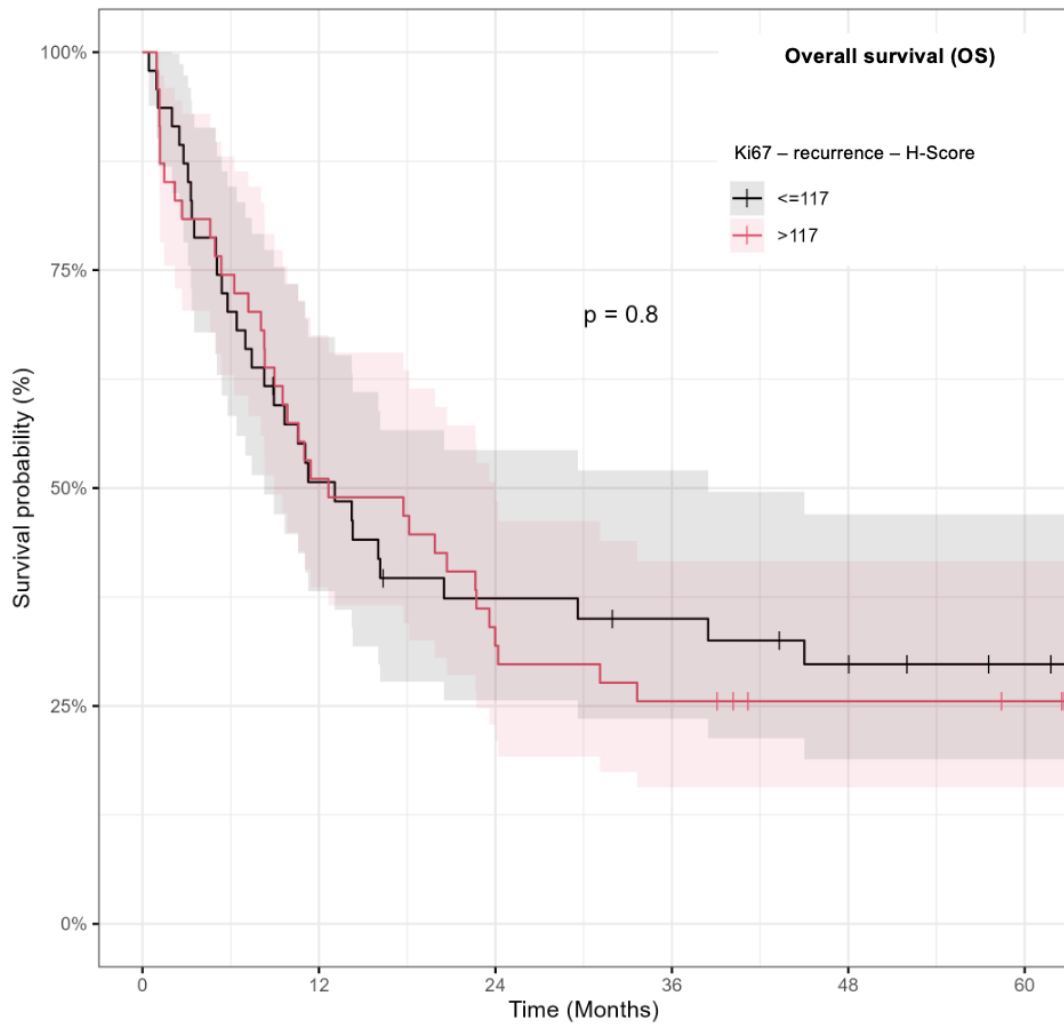
Wie bereits beschrieben verstarben innerhalb der untersuchten Kohorte von 94 insgesamt 67 (71%) Patienten. Von diesen wiesen 32 (68%) keine Ki-67-Expression vor, 35 (74%) hingegen schon. Innerhalb beider Gruppen verstarben die meisten Patienten infolge der untersuchten Krebserkrankung. 15 (32%) Patienten der Ki-67-unterexprimierenden Gruppe entwickelten innerhalb der Nachbeobachtungszeit ein zweites Rezidiv. In der Gruppe Ki-67-überexprimierender Tumoren waren es 16 (34%) Patienten. Diese und weitere Ergebnisse stellt Tabelle 9 dar.

**Tabelle 9:** Deskriptive Analyse des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens sowie des post-Rezidiv-Überlebens mit Ki-67-Über- und Unterexpression

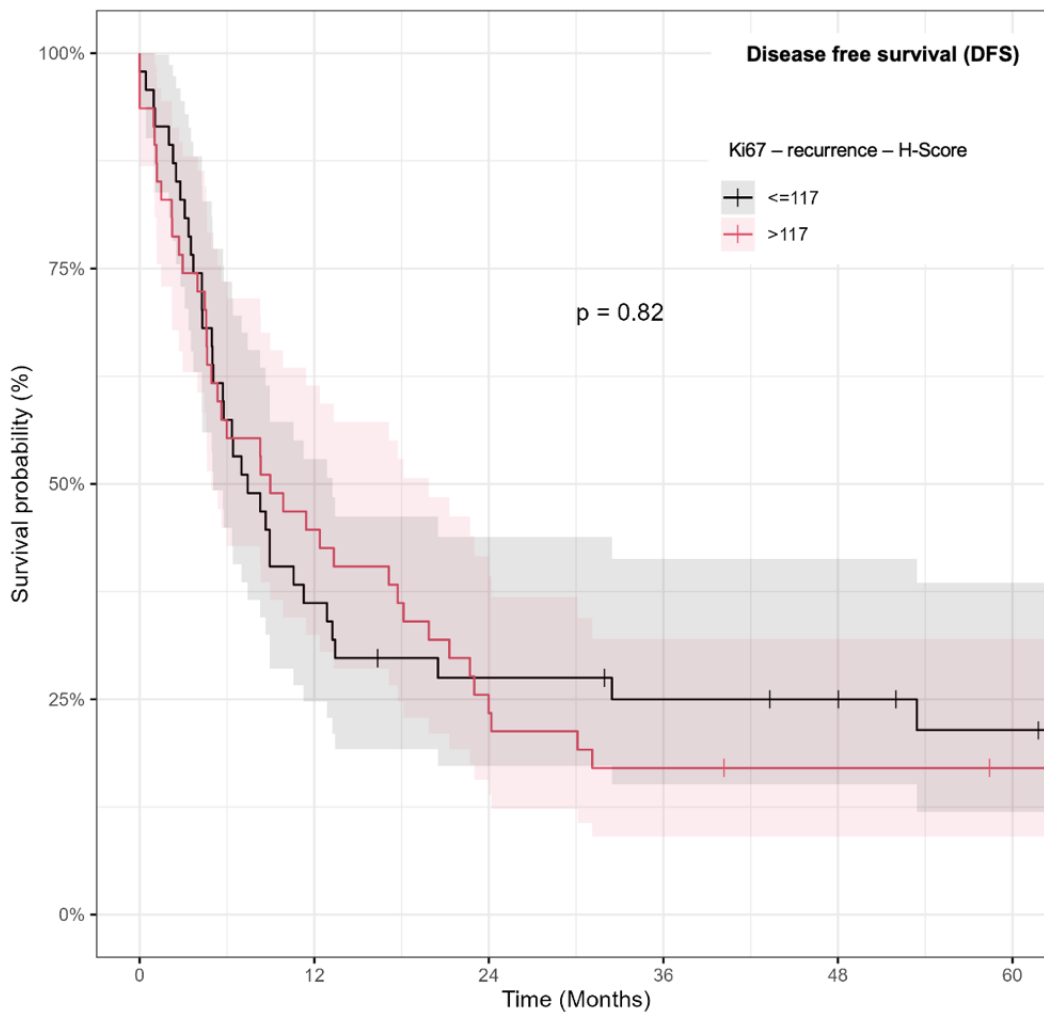
Rezidivtumor	Ki-67 H-Score			
	Variable	Gesamt, N = 94	<=11, N = 47	>11, N = 47
Tod gesamt				
Lebend oder zensiert		27 (29%)	15 (32%)	12 (26%)
Tod		67 (71%)	32 (68%)	35 (74%)
Todesursache				
Lebend oder zensiert		27 (29%)	15 (32%)	12 (26%)
Tod infolge der Krebserkrankung		57 (61%)	28 (60%)	29 (62%)
Tod anderer Ursache		10 (11%)	4 (8.5%)	6 (13%)
Krankheitsfreies Überleben nach dem 1. Rezidiv				
Zensiert		18 (19%)	11 (23%)	7 (15%)
Tod infolge der Krebserkrankung		36 (38%)	17 (36%)	19 (40%)
Tod anderer Ursache		9 (9.6%)	4 (8.5%)	5 (11%)
Lokoregionäres Rezidiv		31 (33%)	15 (32%)	16 (34%)

#### 3.3.1 Überlebensanalyse nach dem Rezidiv

Der Vergleich der Ki-67-überexprimierenden Gruppe (H-Score  $\geq 117$ ) und der Ki-67-unterexprimierenden Gruppe (H-Score  $< 117$ ) zeigte keinen signifikanten Unterschied im post-Rezidiv-Gesamtüberleben und im -krankheitsfreien Überleben. Dies stellt die Kaplan-Meier Kurve in Abbildung 17 und 18 dar ( $p = 0,8$  bzw.  $0,82$ ).



**Abbildung 17:** Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens (OS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von Ki-67



**Abbildung 18:** Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-krankheitsfreien Überlebens (DFS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von Ki-67

### 3.3.2 Multivariate Analyse

In der multivariaten Analyse – dargestellt in Tabelle 10 - wurden die Variablen Alter, CCI-Score, T-Stadium, Lymphknotenstatus und diesmal die Ki-67-Expression analysiert. Auch hier zeigt sich in Anlehnung an die vorausgegangene univariate Analyse kein signifikanter Unterschied bei Expression von Ki-67 sowohl in Bezug auf das post-Rezidiv-Gesamtüberleben als auch in Bezug auf das post-Rezidiv-krankheitsfreie Überleben ( $HR_{OS} = 1,20$ ;  $p_{OS} = 0,5$ ;  $HR_{DFS} = 1,16$ ;  $p_{DFS} = 0,6$ ).

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich lediglich in Bezug auf die Tumorgöße. So haben auch bei Vorliegen einer Ki-67-Expression Tumoren mit dem Stadium rT4 eine signifikant um den Faktor 4,43 höhere Sterberate und auch ein signifikant schlechteres krankheitsfreies Überleben um den Faktor 3,07 nach Rezidiv ( $HR_{OS} = 4,43$ ;  $p_{OS} = <0,001$ ;  $HR_{DFS} = 3,07$ ;  $p_{DFS} = 0,002$ ).

**Tabelle 10:** Multivariate Analyse - Einfluss verschiedener Variablen und Ki-67 auf das Gesamtüberleben (OS) und das krankheitsfreie Überleben (DFS) nach Rezidiv eines OSCC. Signifikante Werte sind fett markiert.

Rezidiv Variable	OS			DFS		
	HR <sup>1</sup>	95%CI <sup>2</sup>	p-Wert	HR <sup>1</sup>	95%CI <sup>2</sup>	p-Wert
Alter	1.01	1.0, 1.02	0.3	1.01	1.00, 1.02	0.14
CCI-Score						
0	—	—		—	—	
1 ≤	0.98	0.56, 1.72	>0.9	1.21	0.71, 2.06	0.5
rT-Stadium						
rT1	—	—		—	—	
rT2	5.05	1.97, 12.9	<b>&lt;0.001</b>	4.71	2.10, 10.6	<b>&lt;0.001</b>
rT3	6.15	2.20, 17.2	<b>&lt;0.001</b>	3.23	1.27, 8.22	<b>0.014</b>
rT4	4.43	1.99, 9.84	<b>&lt;0.001</b>	3.07	1.53, 6.15	<b>0.002</b>
rTx	2.76	1.11, 6.85	<b>0.028</b>	2.47	1.08, 5.65	<b>0.032</b>
rN-Stadium						
N0	—	—		—	—	
N+/x	2.84	1.48, 5.44	<b>0.002</b>	1.92	1.08, 3.42	<b>0.027</b>
Ki-67 – H-Score						
≤117	—	—		—	—	
>117	1.20	0.72, 2.01	0.5	1.16	0.71, 1.89	0.6

HR<sup>1</sup> = Hazard Ratio, CI<sup>2</sup> = Confidence Interval

### 3.4 Ergebnisse der Untersuchung von EGFR

Auch für die Expression von EGFR erfolgte die Analyse nach dem bereits beschriebenen Vorgehen. Tabelle 11 zeigt die deskriptive Analyse. Der H-Score wurde auf 91 festgelegt.

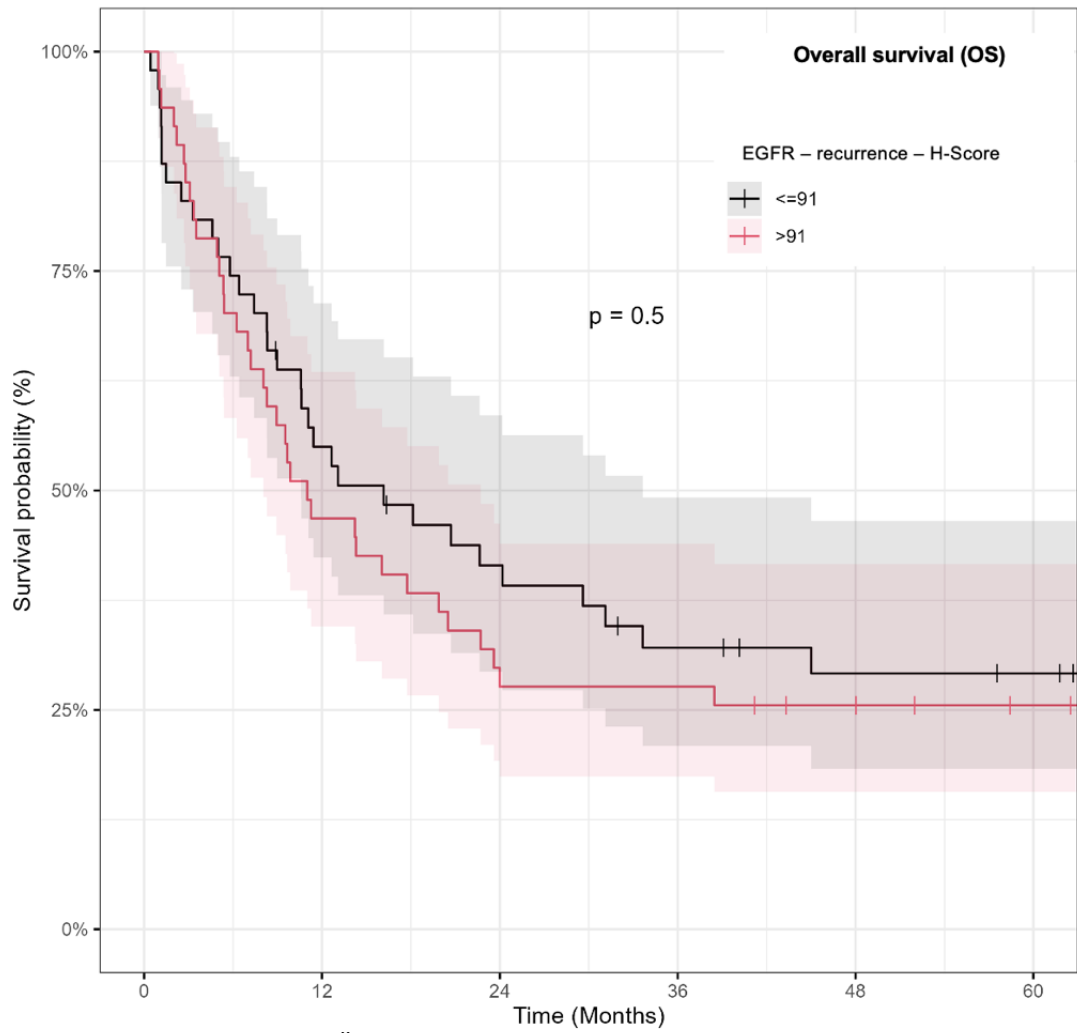
Von 67 insgesamt verstorbenen Patienten hatte der überwiegende Anteil Tumore, welche EGFR überexprimierten (H-Score > 91: 35 (74%) Patienten; H-Score ≤91: 32 (68%) Patienten). Der größere Anteil der verstorbenen Patienten in beiden Vergleichsgruppen hatte ein krebsspezifisches Versterben (H-Score > 91: 30 (64%) Patienten; H-Score ≤ 91: 27 (57%) Patienten). In der Gruppe der EGFR-überexprimierender Tumore entwickelten 13 (28%) Patienten ein zweites Rezidiv, in der Gruppe EGFR-unterexprimierender Tumore waren es 18 (38%) Patienten.

**Tabelle 11:** Deskriptive Analyse des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens, sowie des post-Rezidiv-Überlebens mit EGFR-Über- und Unterexpression

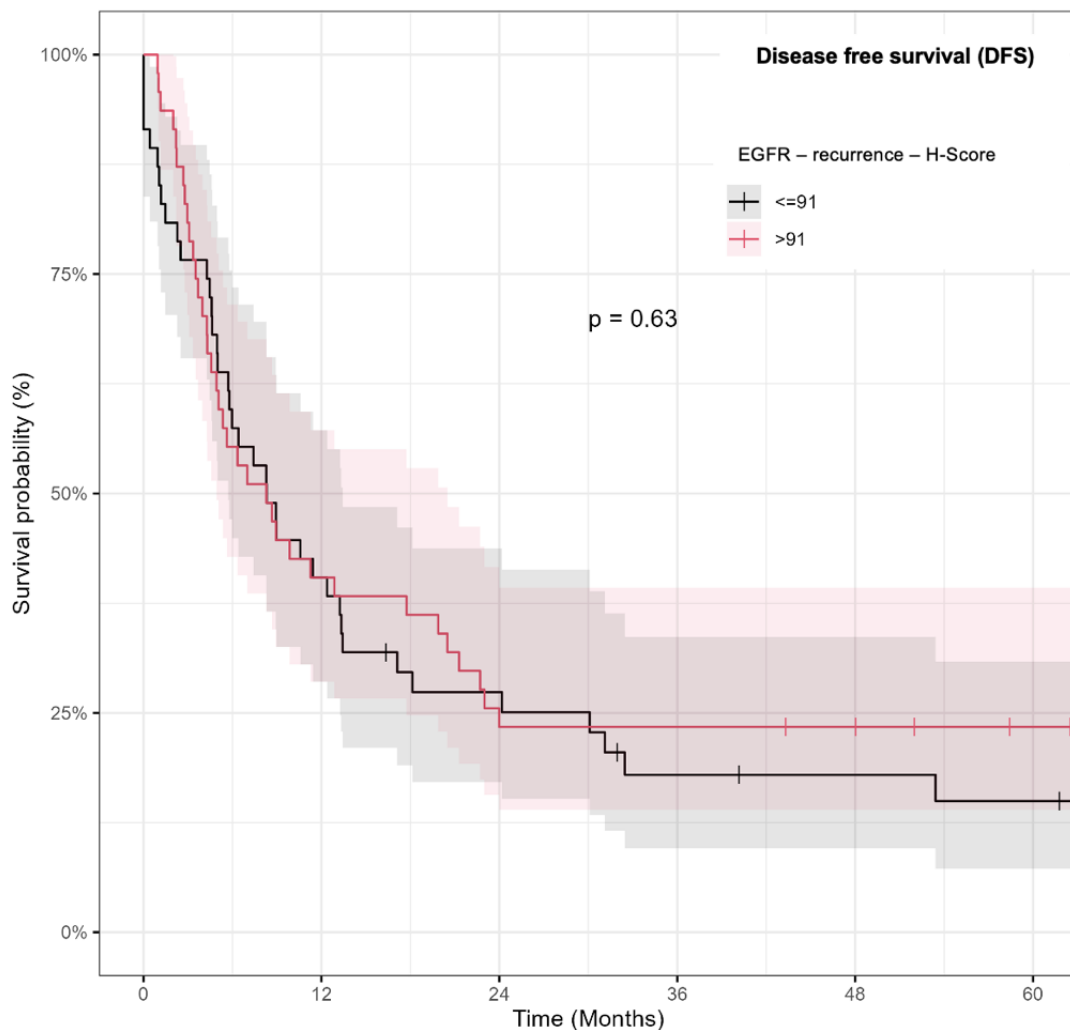
Rezidiv	EGFR H-Score		
	Gesamt, N = 94	≤91, N = 47	>91, N = 47
Tod gesamt			
Lebend oder zensiert	27 (29%)	15 (32%)	12 (26%)
Tod	67 (71%)	32 (68%)	35 (74%)
Todesursache			
Lebend oder zensiert	27 (29%)	15 (32%)	12 (26%)
Tod infolge der Krebserkrankung	57 (61%)	27 (57%)	30 (64%)
Tod anderer Ursache	10 (11%)	5 (11%)	5 (11%)
Krankheitsfreies Überleben nach dem 1. Rezidiv			
Zensiert	18 (19%)	7 (15%)	11 (23%)
Tod infolge der Krebserkrankung	36 (38%)	17 (36%)	19 (40%)
Tod anderer Ursache	9 (9.6%)	5 (11%)	4 (8.5%)
Lokoregionäres Rezidiv	31 (33%)	18 (38%)	13 (28%)

#### 3.4.1 Überlebensanalyse nach dem Rezidiv

Auch die Expression von EGFR oberhalb des festgelegten Grenzwertes (H-Score  $\geq 91$ ) zeigte mit einem p-Wert von 0,5 keinen signifikanten Unterschied im post-Rezidiv-Gesamtüberleben oder krankheitsfreien Überleben ( $p = 0,63$ ) nach Rezidiv verglichen mit der EGFR-unterexprimierenden Kontrollgruppe (H-Score  $< 91$ ) (Abb.19 und Abb.20).



**Abbildung 19:** Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens (OS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von EGFR



**Abbildung 20:** Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-krankheitsfreien Überlebens (DFS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von EGFR

### 3.4.2 Multivariate Analyse

Die Ergebnisse der multivariaten Analyse bezogen auf die Expression von EGFR ähneln denen der Expression von Ki-67. In Tabelle 12 wird dargelegt, dass sich ein signifikanter Unterschied des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens und des -krankheitsfreien Überlebens lediglich bei der Tumorgroße zeigt. So haben auch hier Patienten mit größeren Tumoren ein signifikant schlechteres Überleben und ein verringertes krankheitsfreies Überleben nach Rezidiv. Insgesamt zeigte sich kein signifikanter Unterschied im post-Rezidiv-Gesamtüberleben und im post-Rezidiv-krankheitsfreien Überleben bezogen auf die EGFR-Expression.

**Tabelle 12:** Multivariate Analyse - Einfluss verschiedener Variablen und der Expression von EGFR auf das Gesamtüberleben (OS) und das krankheitsfreie Überleben (DFS) nach Rezidiv eines OSCC. Signifikante Werte sind fett markiert.

Rezidiv Variable	OS			DFS		
	HR <sup>1</sup>	95%CI <sup>2</sup>	p-Wert	HR <sup>1</sup>	95%CI <sup>2</sup>	p-Wert
Alter	1.00	0.99, 1.02	0.4	1.01	1.00, 1.02	1.01
CCI-Score						
0	-	-		—	—	
1 ≤	1.00	0.57, 1.75	>0.9	1.23	0.73, 2.09	0.4
rT-Stadium						
rT1	—	—		—	—	
rT2	4.86	1.89, 12.5	<b>0.001</b>	5.12	2.25, 11.6	<b>&lt;0.001</b>
rT3	5.91	2.10, 16.6	<b>&lt;0.001</b>	3.61	1.41, 9.23	<b>0.007</b>
rT4	4.36	1.94, 9.79	<b>&lt;0.001</b>	3.46	1.68, 7.11	<b>&lt;0.001</b>
rTx	2.76	1.11, 6.86	<b>0.029</b>	2.73	1.19, 6.30	<b>0.018</b>
rN-Stadium						
rN0	—	—		—	—	
rN+/x	2.88	1.50, 5.51	<b>0.001</b>	2.88	1.50, 5.51	<b>0.001</b>
EGFR – H-Score						
≤91	—	—		—	—	
>91	0.94	0.56, 1.58	0.8	0.94	0.56, 1.58	0.8

HR<sup>1</sup> = Hazard Ratio, CI<sup>2</sup> = Confidence Interval

## 4 Diskussion

Eine wichtige Entwicklung in der Krebstherapie ist die Einführung von Immuntherapien. Wie bereits in der Einleitung beschrieben bestehen die kurativen Therapieansätze des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle zum aktuellen Zeitpunkt aus traditionellen Therapien, wie der chirurgischen Therapie, Strahlentherapie und der Chemotherapie. Nachteile sind in der chirurgischen Therapie, dass es sich um einen begrenzten und traumatischen Eingriff handelt, welcher auf die primäre Läsion anwendbar ist, gleichwohl auf metastatische Krebszellen oder Krebszellen im Blutkreislauf keinen Einfluss hat [78]. Die Strahlentherapie zerstört die DNA-Kette von Krebszellen, um eine lokale Behandlung von Tumorwachstum zu erzielen. Hierbei sind meist lange Behandlungszyklen notwendig, welche insgesamt die Körperfunktionen und die Immunabwehr schwächen und eine Vielzahl von Nebenwirkungen mit sich bringen [79]. Bei der Chemotherapie handelt es sich um eine medikamentöse Behandlung, die nur eingeschränkt selektiv ist und so ebenfalls zahlreiche Nebenwirkungen mit sich bringt. Weiterhin kann die Behandlungsmöglichkeit der Chemotherapeutika durch resistente Krebszellen erschwert werden [80]. Diese traditionellen Therapiemöglichkeiten führen vorwiegend zur Eindämmung des Tumors, beheben hingegen jedoch weniger das Problem des Wiederauftretens und der Metastasierung. Insbesondere beim oralen Plattenepithelkarzinom ist allerdings das Auftreten von Rezidivtumoren der häufigste Grund für ein tumorbedingtes Versterben [3]. Immuntherapien haben zum Ziel, effizient und selektiv gegen Tumorwachstum zu wirken. Gleichzeitig sollen sie eine geringere allgemeine Toxizität aufweisen und dadurch eine bessere Lebensqualität für die Patienten gewährleisten [81]. Die Tumorimmuntherapie wurde 2013 von der Zeitschrift Science aufgrund ihrer herausragenden Wirksamkeit und Innovationskraft als bedeutendster wissenschaftlicher Durchbruch gewürdigt [82].

Verschiedene immuntherapeutische Ansätze haben in der palliativen Behandlung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle bereits eine zentrale Bedeutung erlangt. So wurden bereits mehrere Antikörper in die Empfehlungen der aktuellen Behandlungsleitlinie von 2021 aufgenommen.

Cetuximab ist als monoklonaler Antikörper gegen EGFR seit 2004 in Europa von der European-Medicines-Agency (EMA) zugelassen und findet aktuell in der Therapie des Kolonkarzinoms, aber auch des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle Einsatz [83]. Seit 2012 wird Cetuximab in Kombination mit platinhaltiger Chemotherapie und 5-Fluoruracil (EXTREME-Schema) als palliative Erstlinientherapie auch von der Leitlinie der Behandlung des oralen Plattenepithelkarzinoms empfohlen. Auch die Monotherapie mit Cetuximab wird empfohlen, allerdings lediglich für Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand, da eine

Kombinationschemotherapie eine höhere Toxizität bedeutet. Andere Antikörper gegen EGFR wie bspw. Panitumumab konnten nicht die gleiche Effektivität aufzeigen und waren vergleichsweise zu toxisch [3].

Ein weiterer von der aktuellen Leitlinie empfohlener Antikörper ist Pembrolizumab. Bei Pembrolizumab handelt es sich um einen Checkpoint-Inhibitor, ein gegen den PD-1-Rezeptor gerichteten Antikörper. Der PD-1 Rezeptor (programmed cell death 1) ist ein Membranrezeptor von T-Zellen. Binden die Liganden PD-L1 oder PD-L2, die physiologisch, aber auch von einigen Krebszellen exprimiert werden, an diesen Rezeptor, dann wird eine immunologische Antwort gehemmt. Durch Blockade dieses Rezeptors hindert Pembrolizumab die Ausschaltung dieser Immunzellen und fördert so die körpereigene Immunantwort gegen das Tumorwachstum [84]. Vor einer Behandlung mit Pembrolizumab wird zunächst anhand des sogenannten CPS-Scores der Anteil an PD-L1-exprimierenden Tumor- und Immunzellen bestimmt. Bei positivem CPS-Score ( $CPS \geq 1$ ) wird Pembrolizumab als Erstlinienmonotherapie oder in Kombination mit platinhaltigem Chemotherapeutikum und 5-Fluoruracil eingesetzt [3]. B. Burtneß et al. verglichen 2019 in einer großen Phase III-Studie mit 882 Patienten die Therapie mit Pembrolizumab oder Cetuximab jeweils in Kombination mit Chemotherapie beim rezidivierten oder metastasierten Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals Bereich, wovon 30% der Patienten zur Subgruppe des Mundhöhlenkarzinoms zählten. Insgesamt verbesserte die Kombinationstherapie mit Pembrolizumab das Gesamtüberleben im Vergleich zur Therapie mit Cetuximab um 2,3 Monate (13,0 vs. 10,7 Monate). Patienten mit einem CPS-Score von 20 zeigten einen Vorteil von 3,7 Monaten, Patienten mit einem CPS-Score von 1 zeigten einen Überlebensvorteil von 3,2 Monaten. Die Häufigkeit von Nebenwirkungen beider Therapien war vergleichsweise gleich (Nebenwirkungen Grad 3 mit Pembrolizumab 85%, mit Cetuximab 83%). Das progressionsfreie Überleben wurde durch die Therapie mit Pembrolizumab nicht verbessert [3, 85].

Eine weitere Empfehlung spricht die Leitlinie von 2021 für Nivolumab als Zweitlinientherapie aus. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen Antikörper gegen den PD-1-Rezeptor [3, 43].

Ziel der vorliegenden Studie war es, an diese bereits etablierten immunologischen Kenntnisse und noch neuartigen therapeutischen Ansätze anzuknüpfen. Wie bereits erwähnt spielt das Rezidivverhalten beim oralen Plattenepithelkarzinom eine entscheidende Rolle, da häufig Rezidivtumoren entstehen (in 20% der Fälle) und diese wiederum Hauptgrund für tumorbedingtes Versterben sind [3]. Wir untersuchten also das Gesamtüberleben (OS) sowie das krankheitsfreie Überleben (DFS) nach Auftreten eines Rezidivtumors in Abhängigkeit der Expression der drei in dieser Arbeit näher betrachteten Markerproteine. SERPIN B2 ist dabei

ein noch recht unbekanntes Markerprotein, Ki-67 ein bereits sehr gut erforschter Proliferationsmarker mit bisher nur geringfügiger Rolle beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und EGFR ein bereits etabliertes Arbeitstier in der Therapie des fortgeschrittenen oralen Plattenepithelkarzinoms.

Die vorliegende Studie zeichnet sich durch die prospektive Erfassung der klinischen Endpunkte und tumor- und therapiebezogenen Daten aus, welche mithilfe der internen Tumordatenbank der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, durchgeführt werden konnte.

#### 4.1 SERPIN B2

SERPIN B2 (PAI-2) wird wie in der Einleitung bereits beschrieben auch als „unentschlossenes Serpin“ bezeichnet, da seine physiologische Rolle noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Beschrieben ist, dass SERPIN B2 häufig in bösartigen Geweben exprimiert wird. Eine hohe SERPIN B2-Expression wird für solide Krebsarten wie Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs mit einer günstigen Prognose in Verbindung gebracht. Bei Gebärmutter-, Eierstock- und Darmkrebs ist eine hohe SERPIN B2 Expression allerdings mit einer schlechten Prognose verbunden [57, 86]. Oft ist außerdem unklar, ob das Tumorverhalten durch SERPIN B2 beeinflusst wird, welches von Tumorzellen exprimiert wird, oder ob es mutiertes SERPIN B2 ist, welches von infiltrierenden Zellen wie Makrophagen oder Fibroblasten exprimiert wird [87].

Insgesamt ist belegt, dass SERPIN B2 über das sog. uPA-System (Urokinase-Plasminogen-Aktivator) Tumorwachstum, Angiogenese, Adhäsion und auch Invasion von Krebszellen beeinflusst [88]. Versuche mit menschlichen Tumorzelllinien, die menschliches SERPIN B2 exprimieren und in immundefiziente Mäuse eingepflanzt wurden, deuten darauf hin, dass die SERPIN B2-Expression in Tumorzellen die uPA-abhängige Migration, Invasion und Metastasierung hemmt [89-91]. Insgesamt zeigen sich aber unterschiedliche und gegensätzliche Einflüsse von SERPIN B2 je nach Verwendung der Krebszelllinie [54, 57].

Um die Rolle von SERPIN B2 vornehmlich in Bezug auf die Onkogenese detaillierter zu identifizieren sind weitere Untersuchungen notwendig. Dabei war für uns insbesondere der Einfluss auf das Plattenepithelkarzinom im Mund von Interesse.

Baker et al. untersuchte in der Studie „Plasminogen activator system in oral squamous cell

carcinoma“ von 2007 die Konzentration verschiedener Komponenten des bereits genannten Plasminogen-Aktivator-Systems (uPA-System) in Tumor-, sowie in Normalgewebe bei oralem Plattenepithelkarzinom. An 38 Gewebepaarproben wurde mit Hilfe von enzyme-linked immunosorbant Assay (ELISA) die Konzentration von insgesamt fünf Komponenten bestimmt. Hierzu zählte neben SERPIN B2 (PAI-2), das auch Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war, zusätzlich uPA, tPA, uPAR und PAI-1. Außer für tPA wiesen alle Komponenten eine höhere Konzentration im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Normalgewebe ( $p < 0,05$ ) auf. Es zeigte sich u.a. eine negative Korrelation zwischen der Konzentration von SERPIN B2 und der Differenzierung des Tumorgewebes, sodass für SERPIN B2 im Vergleich zu den anderen untersuchten Komponenten eher ein aggressiveres Tumorverhalten postuliert wurde. Insgesamt kamen sie zu dem Schluss, dass besonders die Konzentrationen von uPA, uPAR und PAI-1 in Zusammenhang stehen und die wichtigen, einflussreichen Komponenten des Plasminogen-Aktivator-Systems in Bezug auf orales Plattenepithelkarzinom darstellen. Ein Einfluss auf das Überleben der Patienten wurde nicht untersucht [92].

Weitere Erkenntnisse über den Einfluss von SERPIN B2 auf das orale Plattenepithelkarzinom lieferten im Jahr 2014 Huang et al. in der Studie „SERPINE B2 down-regulation contributes to chemoresistance in head and neck cancer“. Es wurde das Phänomen der erworbenen Cisplatinresistenz bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Hals-Region (HNSCC) untersucht. Bei ca. 10-30% der Patienten mit einem primären Plattenepithelkarzinom und bei bis zu 70% der Patienten mit einem Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms der Kopf-/Hals-Region zeigt sich ein resistentes Verhalten gegenüber der Cisplatin-basierten Chemotherapie [93, 94]. Mit Hilfe von quantitativer Echtzeit-PCR, Western-Blot-Analyse und auch Immunhistochemie wurde an Gewebeproben von 67 Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinomen die Konzentration von SERPIN B2 im Tumorgewebe bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung der Cisplatin-Empfindlichkeit der HNSCC-Zelllinien, wobei eine Korrelation zwischen einer reduzierten SERPIN B2-Expression und einer Cisplatin-Resistenz in HNSCC festgestellt werden konnte. Es erfolgte auch eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse im Rahmen einer 5-jährigen Nachuntersuchungsphase nach Erstdiagnose des Primärtumors. Die Ergebnisse stellten eine verminderte Überlebensrate bei Patienten mit HNSCC dar, welche eine Chemotherapie auf Cisplatin-Basis erhielten und gleichzeitig eine verminderte Expression von SERPIN B2 im Tumorgewebe aufwiesen [95].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie setzte sich mit dem Einfluss der SERPIN B2-Expression auf das post-Rezidiv-Gesamtüberleben und das post-Rezidiv-krankheitsfreie Überleben von Patienten mit einem Rezidiv eines oralen Plattenepithelkarzinoms auseinander.

Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Studie, welche den Überlebenseinfluss von SERPIN B2 auf Rezidivtumore von oralem Plattenepithelkarzinom untersucht.

Passend zu den Ergebnissen von Huang et al. (s.o.) konnte auch in der vorliegenden Untersuchung ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten SERPIN B2-Expression und einer verbesserten Überlebenszeit sowohl in Bezug auf das Gesamtüberleben als auch das krankheitsfreie Überleben nach Rezidivtumor festgestellt werden. Dabei wurde das Augenmerk auf Tumorzellen gelegt, welche eine SERPIN B2 Expression in der immunhistochemischen Analyse aufwiesen.

In einem weiteren Schritt zogen wir allerdings auch eine multivariate Analyse in unsere Studie mit ein. Hierbei erwies sich der Einfluss von SERPIN B2 auf das Überleben unter Berücksichtigung der weiteren Variablen nicht mehr als signifikant. Insbesondere ein fortgeschrittenes Tumorstadium bemessen anhand des TNM-Stadiums zeigte in dieser Untersuchung eine erhöhte Sterberate.

Unsere Studie mit einer Untersuchungskohorte von 94 Patienten stellt aktuell im Vergleich zu oben genannten Studien eine der bisher größten Untersuchungskohorten für das Protein SERPIN B2 in Bezug auf das orale Plattenepithelkarzinom dar. Dennoch handelt es sich um eine begrenzte Kohorte und zukünftige Studien mit größeren Patientenkohorten können Ergebnisse unter Umständen valider darstellen. Zudem dürfte es sinnvoll sein, in kommenden Untersuchungen eine Unterscheidung zwischen der adjuvanten Therapie der Patienten zu berücksichtigen. So könnte der Einfluss einer SERPIN B2-Expression auf das Überleben von Patienten mit Chemotherapie aber auch Strahlentherapie zusätzlich verglichen werden. Weiterhin wäre es interessant, die Expression der anderen Komponenten des uPA-Systems, in welchem der Einfluss von SERPIN B2 auf Tumorwachstum begründet ist, wie uPA, uPAR und PAI-1 auf das Überleben nach einem Rezidivtumor eines oralen Plattenepithelkarzinoms hinzuzuziehen und ggf. mit den Ergebnissen von SERPIN B2 zu vergleichen.

Sicherlich lohnt sich aber die weitere Untersuchung dieses Proteins, da es als Therapieziel oder aber als prognostischer Marker für das Fortschreiten des rezidierten oralen Plattenepithelkarzinoms eine Rolle spielen kann. Ein Einfluss der Expression von SERPIN B2 auf das orale Plattenepithelkarzinom ist nach Zusammenschau o.g. Ergebnisse unumstritten.

## 4.2 Ki-67

Ein weiteres, in dieser Studie untersuchtes Protein, ist Ki-67. Es handelt sich hierbei um einen Proliferationsmarker wie bereits in der Einleitung beschrieben. Unter anderem durch immunhistochemische Analysen von Tumorgewebeproben wird der prozentuale Ki-67-Markierungsindex bestimmt und als prognostischer Marker interpretiert. Insbesondere bei Brust-, Gebärmutterhals-, Lungen- und Urothelkarzinomen sowie bei Lymphomen stellt dieser Marker bereits ein attraktives diagnostisches Werkzeug dar [96]. Auch die aktuelle Leitlinie des oralen Plattenepithelkarzinoms erwähnt die Korrelation einer hohen Expression von Ki-67 mit dem Risiko einer schnellen Tumorprogression. Allerdings wird die Vorhersagekraft bzgl. des individuellen Krankheitsverlaufes als aktuell noch inkonstant bewertet [3].

Erst kürzlich im Jahr 2023 veröffentlichte V. Gupta et al. in der Studie „Ki-67 Expression as a Prognostic Marker: A Comparative Immunohistochemical Analysis of Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma“ neue Ergebnisse über das Verhalten von Ki-67 in Bezug auf das orale Plattenepithelkarzinom. Hier wurde in einer retrospektiven Untersuchung von insgesamt 35 Proben der Unterschied der Expression von Ki-67 in gesunder Mundschleimhaut, in Schleimhaut von oralem Plattenepithelkarzinom und auch in oralen Epitheldysplasien, also Krebsvorstufen verglichen. Dabei konnte eine klare Zunahme der Expression von gesundem Gewebe über Krebsvorstufen bis hin zur malignen Transformation dargestellt werden. V. Gupta et al. postulierte auf dieser Grundlage, dass Ki-67 als prognostischer Biomarker eingesetzt werden könnte. Ausschlusskriterium dieser Untersuchung waren rezidierte Fälle des oralen Plattenepithelkarzinoms [64].

Einen Schritt weiter gingen F. Rebaudi et al. in der Studie „A new method for oral cancer biomarkers detection with a non-invasive cyto-salivary sampling and rapid-highly sensitive ELISA immunoassay: a pilot study in humans“ ebenfalls aus dem Jahr 2023. Hier wurde Ki-67 neben weiteren Biomarkern eingesetzt zur Früherkennung und Diagnose von oralem Plattenepithelkarzinom. Anhand von Cytobrush-Biopsieproben von 15 Patienten mit bereits diagnostiziertem oralem Plattenepithelkarzinom wurden durch ELISA-Technik das Vorhandensein der Biomarker Ki-67, sowie EGFR, p53, PD-L1, HLA-E und B7-H6 analysiert. Die Tumormarker zeigten eine hohe Expression in den Tumorgeweben, waren hingegen im gesunden Gewebe derselben Patienten nahezu nicht nachweisbar. Sie stellten also einen Vergleich der aktuellen Goldstandard-Diagnostik mittels histopathologischer Probebiopsie und der weniger invasiven Phänotypisierungstechnik oraler Läsionen dar, in welcher u.a. Ki-67 als Proliferationsmarker Anwendung findet [97].

Ki-67 zeigt sich also in Übereinstimmung unterschiedlicher Studien als hinweisgebender Proliferationsmarker von oralem Plattenepithelkarzinom. Bisher wurde allerdings der Fokus der Untersuchungen - soweit bekannt - auf die Diagnostik von primärem oralem Plattenepithelkarzinom gelegt und ein Unterschied zwischen Krebsvorstufen und invasivem malignen Wachstum festgestellt. Wir interessierten uns in der vorliegenden Studie für das Expressionsverhalten von Ki-67 bei rezidiviertem oralem Plattenepithelkarzinom. In Anbetracht des aktuellen Forschungsstandes erwarteten wir ein signifikant verschlechtertes post-Rezidiv-Gesamtüberleben bei erhöhter Ki-67 Expression der Rezidivtumoren, da diesem Proliferationsmarker eine negative Prognose zugeschrieben wird. Allerdings zeigte eine erhöhte Expression von Ki-67 wie bereits ausführlich im Abschnitt der Ergebnisse beschrieben keinen signifikanten Unterschied sowohl im Gesamtüberleben als auch im krankheitsfreien Überleben nach Rezidivtumor. Auch die multivariate Zusatzanalyse zeigte lediglich einen signifikanten Überlebensunterschied bei zunehmendem TNM-Stadium, nicht aber bei erhöhter Ki-67-Expression. Diese Ergebnisse können möglicherweise auf die bereits erwähnte begrenzte Studienkohorte von 94 Patienten zurückzuführen sein. Auch wurden in die Studie nicht die unterschiedlichen Therapieverfahren der untersuchten Patienten mit einbezogen. In zukünftigen Untersuchungen könnte das Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Ki-67-Expression in Unterscheidung von bspw. Chemotherapie, Radiatio und palliativer Immuntherapie neue Erkenntnisse liefern. So wird etwa bei Brustkrebs für eine erhöhte Ki-67-Expression zwar eine schlechtere Prognose aufgrund eines höheren malignen Wachstums postuliert, gleichzeitig konnte aber bei höherer Ki-67-Expression ein verbessertes Ansprechen auf Chemotherapeutika nachgewiesen werden, was wiederum mit einem verbesserten Überleben assoziiert wird [63].

### 4.3 EGFR

Das dritte untersuchte Protein der vorliegenden Studie ist EGFR. Hierbei handelt es sich im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Proteinen - SERPIN B2 und Ki-67 – um den in Bezug auf sein Verhalten beim oralem Plattenepithelkarzinom am besten untersuchten Antikörper. Mit Cetuximab als monoklonalem Antikörper gegen EGFR, spielt dieses Protein bereits eine wichtige Rolle in der Therapie des fortgeschrittenen Krebses in der Mundhöhle [83].

Wie bereits beschrieben handelt es sich bei EGFR um einen Wachstumsfaktor. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass EGFR bei ca. 80% der Plattenepithelkarzinome im Kopf-, Halsbereich überexprimiert ist. Diese Überexpression geht aufgrund der physiologischen

Eigenschaften von EGFR mit einer vermehrten Tumordinvasion und -metastasierung, also einem aggressiveren Phänotyp, einer reduzierten Überlebensrate und schlechteren Prognose sowie einer erhöhten Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie einher [68, 73, 98, 99].

Auch unsere Studie beschäftigt sich - wie bei den beiden bereits beschriebenen Proteinen - mit der Überlebenswahrscheinlichkeit nach rezidiertem oralem Plattenepithelkarzinom in Abhängigkeit der Expression von EGFR. Interessanterweise konnten wir in unserer Studie aber ganz anders, als erwartet keine signifikant verschlechterte post-Rezidiv-Überlebenswahrscheinlichkeit bei erhöhter EGFR-Expression feststellen. Sowohl in der univariaten Kaplan-Meier Analyse als auch unter Berücksichtigung weiterer Faktoren im Rahmen der Cox-Regression zeigte eine erhöhte EGFR-Expression keinen Unterschied im post-Rezidiv-Gesamtüberleben oder im post-Rezidiv-krankheitsfreien Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe mit geringer EGFR-Expression.

Im Jahr 2023 führten J. L. Cívico-Ortega et al. die erste Meta-Analyse zur prognostischen und klinischen Rolle von EGFR beim oralem Plattenepithelkarzinom durch, welche anhand von 50 Studien und insgesamt 4631 Patienten ausgewertet wurde. Hieraus ging hervor, dass eine Überexpression von EGFR signifikant mit einem schlechten Gesamtüberleben (HR = 1,38; 95% CI = 1,06-1,79;  $p = 0,02$ ) einherging. Außerdem wurde mit einer EGFR-Überexpression ein N+ Status (Odds Ratio [OR] = 1,37; 95% CI = 1,01-1,86;  $p = 0,04$ ) und mäßig schlecht differenzierte Tumore (OR = 1,43; 95% CI = 1,05-1,94;  $p = 0,02$ ) assoziiert. Sie kamen zu dem Schluss, dass der immunhistochemische Nachweis von EGFR routinemäßig in die prognostische Bewertung von Patienten mit Mundhöhlenkrebs einbezogen werden sollte. Gleichzeitig begrenzten sie ihre Ergebnisse aber auch insofern, als dass eine große Variabilität der experimentellen Methoden, der genutzten Anti-EGFR-Antikörper, der Antikörperverdünnungen und der gewählten Grenzwerte der untersuchten Studien bestand [70].

Ein wichtiger Unterschied unserer Studie zu den von J.L. Cívico-Ortega et al. untersuchten Studien ist zum einen der Fokus auf Rezidivtumore. Soweit bekannt handelt es sich um die erste Studie, die lediglich Rezidivtumore und das Verhalten von EGFR untersucht hat. Die Ergebnisse dieser Studie werfen sogleich die Frage auf, ob Rezidivtumore bei EGFR-Überexpression möglicherweise anders als Primärtumore keine veränderte Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen.

Zum anderen ist ein weiterer wichtiger Unterschied in der Auswertungsmethode zu finden. Der Großteil der Studien aus o.g. Metaanalyse haben die immunhistochemische Reaktion der

Tumorproben mit einem prozentualen Grenzwert ausgewertet. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist diese Studie die erste, die die Grenzwertfestlegung in genannter Fragestellung der EGFR-Expression bei oralem Plattenepithelkarzinom mit Hilfe des H-Scores gewählt hat. J.L. Cívico-Ortega et al. beschreiben, dass der Einfluss der EGFR-Überexpression auf das Überleben dann erzielt wird, wenn  $\geq 10\%$  der EGFR positiven Tumorzellen als Grenzwert verwendet werden ( $p < 0,001$ ) [70]. Der H-Score ergänzt zu der Untersuchung eines Färbeanteils - wie es bei prozentualer Grenzwertfestlegung geschieht - auch die Berücksichtigung der Färbeintensität des untersuchten Biomarkers. Die Kombination aus immunhistochemischer Färbung und H-Score ist eine überlegene Methode zur Proteindetektion und besonders wertvoll für die Quantifizierung von Proteinen innerhalb spezifischer interessierender Zelltypen [77, 100].

Dass die Überexpression von EGFR in der Onkogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms einen sehr häufigen onkogenen Mechanismus darstellt und insgesamt auch mit einer schlechteren Überlebensrate einhergeht, steht aber außer Frage.

T. Naruse et al. untersuchten im Rahmen der Studie „Cetuximab for the treatment of locally advanced and recurrent/metastatic oral cancer: An investigation of distant metastasis“ in Japan retrospektiv die Wirksamkeit von Cetuximab zwischen 2012 bis 2015 bei fortgeschrittenem oralem Plattenepithelkarzinom. Die Ergebnisse zeigten, dass die Kombinationstherapie aus Cetuximab mit Strahlentherapie und platinbasierter Chemotherapie höhere Ansprechraten und eine signifikant höhere Gesamtüberlebensrate erzielen konnte [101]. Vermoken et al. zeigte 2008 in einer multizentrischen randomisierten klinischen Phase III Studie in 81 Zentren innerhalb von 17 europäischen Ländern, dass Cetuximab in Kombination mit Cisplatin und 5-Fluoruracil im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie ein verbessertes Gesamtüberleben erzielen konnte (von 7,4 Monate auf 10,1 Monate;  $p = 0,04$ ) [102].

Diese und weitere zahlreiche Ergebnisse anderer Studien lassen darauf schließen, dass es sich bei Cetuximab um ein etabliertes Werkzeug in der zielgerichteten Krebstherapie gegen orales Plattenepithelkarzinom mit der Zielstruktur EGFR handelt. Daher findet es auch bereits breitflächig Einsatz in der Tumorthherapie.

Es bleibt aber die Frage offen, ob es sich bei Cetuximab um ein zuverlässiges Instrument in der Therapie des Krebses der Mundhöhle handelt. Insbesondere stellen Resistenzentwicklungen mutierter EGFR-Formen gegenüber Cetuximab eine Herausforderung dar. M.Moral et al. zeigten, dass Cetuximab nur gegen den Wildtyp-EGFR wirksam ist [103]. Tumorzellen von Kopf-, Halstumoren mit einer Cetuximab-Resistenz zeigen bspw. eine Hochregulation des

EGFR-Liganden Heregulin, welcher durch die AKT-Signalübertragung eine verbesserte Überlebensfähigkeit der Tumorzellen zeigt [104].

Tyrosinkinasase-Inhibitoren, wie bspw. Gefitinib, der bereits in der Therapie von lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom eingesetzt wird, blockieren EGFR-Strukturen von intrazellulär. Studien haben bereits darlegen können, dass Patienten mit genannter EGFR-Mutation von einer solchen Therapie profitieren. Doch brachten Tyrosinkinase-Inhibitoren bisher keinen grundsätzlichen signifikanten Nutzen bei gleichzeitig hohen Raten an unerwünschten Nebenwirkungen mit sich [3].

Auch wenn demnach das Verhalten von EGFR beim oralen Plattenepithelkarzinom bereits intensiver erforscht wurde als von anderen Antikörpern sind weitere Untersuchungen notwendig und wichtig. Insbesondere, weil es einen so starken Konsens über den Zusammenhang von EGFR-Überexpression und verkürzter Überlebenszeit gibt, bleibt es eine wichtige Zielstruktur in der Krebstherapie. Doch es ist fraglich, welche Patientengruppen von einer Therapie mit Cetuximab profitieren und ob diese Bewertung bei Rezidivtumoren anders ausfallen muss. Bisher konnte zur Selektion dieser Patientengruppe kein prädiktiver Biomarker gefunden werden [3, 105, 106].

Auch in Bezug auf EGFR sind Limitationen der hier dargelegten Studie zu nennen. Diese sind zunächst wieder die begrenzte Studienkohorte von 94 Patienten. Außerdem wurde das Therapieverfahren dieser 94 Patienten nicht unterschieden, was insbesondere in der Fragestellung der Cetuximabtherapie bei unterschiedlicher EGFR-Expression interessant gewesen wäre. Zukünftig könnte dies in einem retrospektiven Untersuchungsansatz derselben Kohorte genauer betrachtet werden.

## 5 Zusammenfassung

Krebs in der Mundhöhle gehört zu den zehn häufigsten Krebserkrankungen der Welt, wobei über 90% dieser soliden Tumore Plattenepithelkarzinome sind. Etwa 20% der Patienten entwickeln ein lokoregionäres Tumorrezidiv, was der häufigste Grund für ein tumorbedingtes Versterben ist. Aktuelle Standardtherapien beinhalten die chirurgische Resektion sowie adjuvante Strahlen- und/oder Chemotherapie, zunehmend stehen aber Immuntherapien und immunologische Marker im Zentrum der Forschung.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der Expression der Markerproteine SERPIN B2, Ki-67 und EGFR in rezidiviertem Tumorgewebe auf die post-Rezidiv-Überlebenswahrscheinlichkeit zu untersuchen.

Die Untersuchung wurde mithilfe einer prospektiv geführten Untersuchungskohorte von 94 Patienten vorgenommen, die zwischen 1992 und 2019 mit einem nicht-metastasierten Primärtumor des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie der Universität zu Lübeck diagnostiziert wurden und im Verlauf einen lokoregionären Rezidivtumor entwickelten. Tumorgewebeproben wurden immunhistochemisch unter Verwendung der Bildanalysesoftware Qupath in Kombination mit einer automatisierten H-Score-Berechnung durchgeführt. Die Überlebensanalysen erfolgten mittels Kaplan-Meier-Methode und der Log-Rank-Test.

Die Ergebnisse zeigten, dass Patienten mit einer erhöhten SERPIN B2-Expression ein signifikant besseres post-Rezidiv-Gesamt- und krankheitsfreies Überleben hatten ( $p = 0,0027$  bzw.  $p = 0,0035$ ). Anders als anhand des aktuellen Standes der einschlägigen Literatur zu erwarten war, zeigten erhöhte Ki-67- und EGFR-Expressionen keinen signifikanten Einfluss auf die post-Rezidiv-Überlebenszeit.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse die Bedeutung von SERPIN B2 für das Überleben von Patienten mit rezidiviertem oralen Plattenepithelkarzinom. Sie werfen zudem die Frage auf, ob sich das Tumorverhalten zwischen Primär- und Rezidivtumor verändert. Es besteht die Annahme, dass sich die gängigen Marker Ki-67 und EGFR in rezidiviertem Tumorgewebe anders auf die Überlebenszeit der Patienten auswirken als bisher angenommen. Aufgrund der hohen Rezidivrate des oralen Plattenepithelkarzinoms sollte in künftigen Studien in Frage gestellt werden, inwieweit sich die Tumorbilogie zwischen Primär- und Rezidivtumoren unterscheidet. Zukünftige Studien könnten auch den prognostischen Wert von SERPIN B2 und der weiteren Komponenten des uPA-Signalweges sowie deren Rolle in der Chemoresistenz und Strahlentherapie des oralen Plattenepithelkarzinoms untersuchen.

### III. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Vereinfachte schematische Darstellung der Rolle von SERPIN B2 in der Krebsbiologie anhand des uPA-Signalweges, erstellt mit BioRender.com.....	14
<b>Abbildung 2:</b> Ki-67 Expression in verschiedenen Phasen des Zellzyklus, erstellt mit BioRender.com. ....	15
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors, links in aktiver Form durch Bindung des Liganden EGF, rechts in inaktiver Form durch Hemmung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab, erstellt mit BioRender.com.....	17
<b>Abbildung 4:</b> Patientenkollektiv der vorliegenden Studie entstehend aus einer Ursprungskohorte (n = 1088) und reduziert auf ein Patientenkollektiv von 94 Patienten aufgrund genannter Ein- und Ausschlusskriterien, erstellt mit BioRender.com. ....	20
<b>Abbildung 6:</b> Excel-Tabellen Übersicht zur Identifikation der einzelnen Proben des TMA-Derrayers.....	22
<b>Abbildung 5:</b> Tissue micro array (TMA) mit einzelnen TMA-Cores am Beispiel der Tumorrezidivproben von SERPIN-B2.....	22
<b>Abbildung 7:</b> TMA-Derrayer nun mithilfe der Analyse-Software Qupath zur Auswertung in ein Raster gelegt.....	24
<b>Abbildung 8:</b> Feature Cell Detection durchgeführt an einem beispielhaften Core eines SERPIN B2 TMAs. Das linke Bild zeigt die unbearbeitete Tumorprobe, das rechte Bild zeigt die detektierten Zellen, welche bisher nicht weiter klassifiziert wurden.....	25
<b>Abbildung 9:</b> Das Core aus der Abbildung zuvor wurde nun mithilfe der erstellten „Annotations“ hinsichtlich seiner Zellgewebe ausgewertet und zeigt zum größten Teil Tumorzellen.....	26
<b>Abbildung 10:</b> Bearbeitung der Färbeintensität eines Cores in QuPath mit Hilfe der sogenannten "Cell intensitiy classification". Blau bedeutet, die Zellen haben keine immunhistochemische Reaktion gezeigt, gelb über orange bis rot zeigen aufsteigende Färbeintensität im Sinne einer immunhistochemischen Reaktion. Weiterhin erkennt man in grün gefärbt Stromazellen und in lila gefärbte Immunzellen.....	27
<b>Abbildung 11:</b> Vor vs. Nach der Auswertung des exemplarischen TMA-Cores von SERPIN B2.	

Links zeigt das Core vor Auswertung, rechts zeigt die finale Auswertung in QuPath mit der Unterscheidung in Tumorgewebe (blau, gelb, orange und rot) und andere (bspw. Stromazellen in grün), sowie Zellen mit immunhistochemischer Reaktion oder ohne (blau).....	27
<b>Abbildung 12:</b> Geringe Expression (links) vs. starke Expression (rechts) von SERPIN B2 in immunhistochemisch untersuchten Tumorgewebeproben .....	29
<b>Abbildung 13:</b> Geringe Expression (links) vs. starke Expression (rechts) von Ki-67 in immunhistochemisch untersuchten Tumorgewebeproben .....	30
<b>Abbildung 14:</b> Geringe Expression (links) vs. starke Expression (rechts) von EGFR in immunhistochemisch untersuchten Tumorgewebeproben .....	30
<b>Abbildung 15:</b> Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens (OS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von SERPIN B2 .....	36
<b>Abbildung 16:</b> Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-krankheitsfreien Überlebens (DFS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von SERPIN B2 .....	37
<b>Abbildung 17:</b> Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens (OS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von Ki-67 .....	41
<b>Abbildung 18:</b> Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-krankheitsfreien Überlebens (DFS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von Ki-67 .....	42
<b>Abbildung 19:</b> Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens (OS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von EGFR .....	45
<b>Abbildung 20:</b> Kaplan-Meier Überlebenskurve des post-Rezidiv-krankheitsfreien Überlebens (DFS) von Patienten mit einem OSCC Rezidivtumor stratifiziert nach Cutoff der Expression von EGFR .....	46

#### IV. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> T-Klassifikation (Tumorausdehnung) für Mundhöhlenkarzinome aus der TNM-Klassifikation der malignen Tumore, 8.Auflage [3, 27] .....	5
<b>Tabelle 2:</b> N-Klassifikation (regionäre Lymphknotenmetastasen) für Mundhöhlenkarzinome aus der TNM-Klassifikation der malignen Tumore, 8.Auflage [3, 27] .....	6
<b>Tabelle 3:</b> M-Klassifikation (Metastasierung) für Mundhöhlenkarzinome aus der TNM-Klassifikation der malignen Tumore, 8.Auflage [3, 27] .....	6
<b>Tabelle 4:</b> Tumorstadien nach UICC-Kriterien aus der TNM-Klassifikation der malignen Tumore, 8.Auflage [3, 27].....	7
<b>Tabelle 5:</b> Angaben zu Färbungen der verschiedenen untersuchten Proteine .....	23
<b>Tabelle 6:</b> Demografische und klinische Merkmale des vorliegenden Patientenkollektivs.....	32
<b>Tabelle 7:</b> Deskriptive Analyse des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens, sowie des post-Rezidiv-Überlebens mit SERPIN B2 Über- und Unterexpression .....	35
<b>Tabelle 8:</b> Multivariate Analyse - Einfluss verschiedener Variablen und SERPIN B2 auf das Gesamtüberleben (OS) und das krankheitsfreie Überleben (DFS) nach Rezidiv eines OSCC. Signifikante Werte sind fett markiert.....	39
<b>Tabelle 9:</b> Deskriptive Analyse des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens sowie des post-Rezidiv-Überlebens mit Ki-67-Über- und Unterexpression .....	40
<b>Tabelle 10:</b> Multivariate Analyse - Einfluss verschiedener Variablen und Ki-67 auf das Gesamtüberleben (OS) und das krankheitsfreie Überleben (DFS) nach Rezidiv eines OSCC. Signifikante Werte sind fett markiert.....	43
<b>Tabelle 11:</b> Deskriptive Analyse des post-Rezidiv-Gesamtüberlebens, sowie des post-Rezidiv-Überlebens mit EGFR-Über- und Unterexpression.....	44
<b>Tabelle 12:</b> Multivariate Analyse - Einfluss verschiedener Variablen und der Expression von EGFR auf das Gesamtüberleben (OS) und das krankheitsfreie Überleben (DFS) nach Rezidiv eines OSCC. Signifikante Werte sind fett markiert. ....	47

## V. Literaturverzeichnis

1. Johnson, D.E., Burtness, B., Leemans, C.R., Lui, V.W.Y., Bauman, J.E., Grandis, J.R. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020. 6(1). p. 92.
2. Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Krebs in Deutschland für 2019/2020. 14 ed., Berlin 2023. p. 24-27.
3. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen und Medizinischen Fachgesellschaften, S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0. AWMF Registernummer: 007/100OL. 2021. p. 16-78
4. Warnakulasuriya, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*. 2009. 45(4-5). p. 309-316.
5. Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13 ed., Berlin 2021. p. 32-35.
6. Howaldt, H.P., Vorast, H., Blecher, J.C., Reicherts, M., Kainz, M. Ergebnisse aus dem DÖSAK-Tumorregister. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*. 2000. 4(1). p. S216-S225.
7. Bagnardi, V., Blangiardo, M., La Vecchia, C., Corrao, G. Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Research and Health*. 2001. 25(4).
8. Kumar, M., Nanavati, R., Modi, T.G., Dobariya, C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2016. 12(2). p. 458-463.
9. Talamini, R., Bosetti, C., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Levi, F., Bidoli, E., Negri, E., Pasche, C., Vaccarella, S., Barzan, L., Franceschi, S. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control*. 2002. 13(10). p. 957-964.
10. Critchley, J.A., Unal, B. Health effects associated with smokeless tobacco: a systematic review. *Thorax*. 2003. 58(5). p. 435-443.
11. Bosetti, C., Talamini, R., Levi, F., Negri, E., Franceschi, S., Airoidi, L., La Vecchia, C. Fried foods: a risk factor for laryngeal cancer? *Br J Cancer*. 2002. 87(11). p. 1230-1233.
12. Oreggia, F., De Stefani, E., Boffetta, P., Brennan, P., Deneo-Pellegrini, H., Ronco, A.L. Meat, fat and risk of laryngeal cancer: a case-control study in Uruguay. *Oral Oncol*. 2001. 37(2). p. 141-145.
13. Miller, C.S., Johnstone, B.M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001. 91(6). p. 622-635.
14. D'Souza, G., Kreimer, A.R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W.M., Westra, W.H., Gillison, M.L. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007. 356(19). p. 1944-1956.
15. Ndiaye, C., Mena, M., Alemany, L., Arbyn, M., Castellsagué, X., Laporte, L., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., Trottier, H. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2014.

- 15(12). p. 1319-1331.
16. Zheng, Z., Park, J.Y., Guillemette, C., Schantz, S.P., Lazarus, P. Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2001. 93(18). p. 1411-1418.
  17. Speight, P.M., Farthing, P.M. The pathology of oral cancer. *Br Dent J.* 2018. 225(9). p. 841-847.
  18. Klein, C., Zender, L., Malek, N.P. Grundlagen der malignen Transformation. *Der Onkologe.* 2016. 22(1). p. 5-12.
  19. Virchow, R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr Rev.* 1989. 47(1). p. 23-25.
  20. Luo, Z., Wang, Q., Lau, W.B., Lau, B., Xu, L., Zhao, L., Yang, H., Feng, M., Xuan, Y., Yang, Y., Lei, L., Wang, C., Yi, T., Zhao, X., Wei, Y., Zhou, S. Tumor microenvironment: The culprit for ovarian cancer metastasis? *Cancer Lett.* 2016. 377(2). p. 174-182.
  21. Pitiphat, W., Diehl, S.R., Laskaris, G., Carstos, V., Douglass, C.W., Zavras, A.I. Factors associated with delay in the diagnosis of oral cancer. *J Dent Res.* 2002. 81(3). p. 192-197.
  22. Leslie, A., Fyfe, E., Guest, P., Goddard, P., Kabala, J.E. Staging of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a comparison of MRI and CT in T- and N-staging. *J Comput Assist Tomogr.* 1999. 23(1). p. 43-49.
  23. Rao, L.P., Das, S.R., Mathews, A., Naik, B.R., Chacko, E., Pandey, M. Mandibular invasion in oral squamous cell carcinoma: investigation by clinical examination and orthopantomogram. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004. 33(5). p. 454-457.
  24. Hohlweg-Majert, B., Metzger, M.C., Voss, P.J., Hölzle, F., Wolff, K.D., Schulze, D. Preoperative cervical lymph node size evaluation in patients with malignant head/neck tumors: comparison between ultrasound and computer tomography. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009. 135(6). p. 753-759.
  25. Mupparapu, M., Shanti, R.M. Evaluation and Staging of Oral Cancer. *Dent Clin North Am.* 2018. 62(1). p. 47-58.
  26. Huang, S.H., O'Sullivan, B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2017. 18(7). p. 40.
  27. Wittekind, C. TNM: Klassifikation maligner Tumoren. 8. Auflage 2017.
  28. Levendag, P.C., Nowak, P.J., van der Sangen, M.J., Jansen, P.P., Eijkenboom, W.M., Planting, A.S., Meeuwis, C.A., van Putten, W.L. Local tumor control in radiation therapy of cancers in the head and neck. *Am J Clin Oncol.* 1996. 19(5). p. 469-477.
  29. Loree, T.R., Strong, E.W. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg.* 1990. 160(4). p. 410-414.
  30. Abler, A., Roser, M., Weingart, D. [On the indications for and morbidity of segmental resection of the mandible for squamous cell carcinoma in the lower oral cavity]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2005. 9(3). p. 137-142.

31. Byers, R.M., El-Naggar, A.K., Lee, Y.Y., Rao, B., Fornage, B., Terry, N.H., Sample, D., Hankins, P., Smith, T.L., Wolf, P.J. Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue? *Head Neck*. 1998. 20(2). p. 138-144.
32. Koo, B.S., Lim, Y.C., Lee, J.S., Choi, E.C. Management of contralateral N0 neck in oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2006. 28(10). p. 896-901.
33. Zelefsky, M.J., Harrison, L.B., Fass, D.E., Armstrong, J.G., Shah, J.P., Strong, E.W. Postoperative radiation therapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx: impact of therapy on patients with positive surgical margins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993. 25(1). p. 17-21.
34. Lefebvre, J.L., Coche-Dequeant, B., Buisset, E., Mirabel, X., Van, J.T., Prevost, B. Management of early oral cavity cancer. Experience of Centre Oscar Lambret. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994. 30b(3). p. 216-220.
35. Denis, F., Garaud, P., Bardet, E., Alfonsi, M., Sire, C., Germain, T., Bergerot, P., Rhein, B., Tortochaux, J., Oudinot, P., Calais, G. Late toxicity results of the GORTEC 94-01 randomized trial comparing radiotherapy with concomitant radiochemotherapy for advanced-stage oropharynx carcinoma: comparison of LENT/SOMA, RTOG/EORTC, and NCI-CTC scoring systems. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003. 55(1). p. 93-98.
36. Epstein, J.B., Lunn, R., Le, N., Stevenson-Moore, P. Periodontal attachment loss in patients after head and neck radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998. 86(6). p. 673-677.
37. Pignon, J.P., Bourhis, J., Domenge, C., Designé, L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet*. 2000. 355(9208). p. 949-955.
38. Gupta, S., Portales-Castillo, I., Daher, A., Kitchlu, A. Conventional Chemotherapy Nephrotoxicity. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2021. 28(5). p. 402-414.e401.
39. Bernier, J., Cooper, J.S., Pajak, T.F., van Glabbeke, M., Bourhis, J., Forastiere, A., Ozsahin, E.M., Jacobs, J.R., Jassem, J., Ang, K.K., Lefebvre, J.L. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck*. 2005. 27(10). p. 843-850.
40. Boysen, M., Lövdal, O., Tausjö, J., Winther, F. The value of follow-up in patients treated for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer*. 1992. 28(2-3). p. 426-430.
41. Goodwin, W.J., Jr. Salvage surgery for patients with recurrent squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: when do the ends justify the means? *Laryngoscope*. 2000. 110(3 Pt 2 Suppl 93). p. 1-18.
42. Peiffert, D., Pernot, M., Malissard, L., Aletti, P., Hoffstetter, S., Kozminski, P., Luporsi, E., Dartois, D., Bey, P. Salvage irradiation by brachytherapy of velotonsillar squamous cell carcinoma in a previously irradiated field: results in 73 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994. 29(4). p. 681-686.

43. Ferris, R.L., Blumenschein, G., Jr., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A.D., Licitra, L., Harrington, K., Kasper, S., Vokes, E.E., Even, C., Worden, F., Saba, N.F., Iglesias Docampo, L.C., Haddad, R., Rordorf, T., Kiyota, N., Tahara, M., Monga, M., Lynch, M., Geese, W.J., Kopit, J., Shaw, J.W., Gillison, M.L. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med.* 2016. 375(19). p. 1856-1867.
44. Gettins, P.G. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev.* 2002. 102(12). p. 4751-4804.
45. Lucas, A., Yaron, J.R., Zhang, L., Macaulay, C., McFadden, G. Serpins: Development for Therapeutic Applications. *Methods Mol Biol.* 2018. 1826. p. 255-265.
46. Fayard, B., Bianchi, F., Dey, J., Moreno, E., Djaffer, S., Hynes, N.E., Monard, D. The serine protease inhibitor protease nexin-1 controls mammary cancer metastasis through LRP-1-mediated MMP-9 expression. *Cancer Res.* 2009. 69(14). p. 5690-5698.
47. Syrovets, T., Simmet, T. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cell Mol Life Sci.* 2004. 61(7-8). p. 873-885.
48. Schroder, W.A., Hirata, T.D., Le, T.T., Gardner, J., Boyle, G.M., Ellis, J., Nakayama, E., Pathirana, D., Nakaya, H.I., Suhrbier, A. SerpinB2 inhibits migration and promotes a resolution phase signature in large peritoneal macrophages. *Sci Rep.* 2019. 9(1). p. 12421.
49. Danø, K., Andreasen, P.A., Grøndahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L.S., Skriver, L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res.* 1985. 44. p. 139-266.
50. Gandolfo, G.M., Conti, L., Vercillo, M. Fibrinolysis components as prognostic markers in breast cancer and colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 1996. 16(4b). p. 2155-2159.
51. Duffy, M.J. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des.* 2004. 10(1). p. 39-49.
52. Ellis, V., Scully, M.F., Kakkar, V.V. Plasminogen activation initiated by single-chain urokinase-type plasminogen activator. Potentiation by U937 monocytes. *J Biol Chem.* 1989. 264(4). p. 2185-2188.
53. Blasi, F., Sidenius, N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett.* 2010. 584(9). p. 1923-1930.
54. Croucher, D.R., Saunders, D.N., Lobov, S., Ranson, M. Revisiting the biological roles of PAI2 (SERPINB2) in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008. 8(7). p. 535-545.
55. Valiente, M., Obenauf, A.C., Jin, X., Chen, Q., Zhang, X.H., Lee, D.J., Chافت, J.E., Kris, M.G., Huse, J.T., Brogi, E., Massagué, J. Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell.* 2014. 156(5). p. 1002-1016.
56. Schroder, W.A., Major, L.D., Le, T.T., Gardner, J., Sweet, M.J., Janciauskiene, S., Suhrbier, A. Tumor cell-expressed SerpinB2 is present on microparticles and inhibits metastasis. *Cancer Med.* 2014. 3(3). p. 500-513.
57. Nordengren, J., Fredstorp Lidebring, M., Bendahl, P.O., Brünner, N., Fernö, M., Högberg, T., Stephens, R.W., Willén, R., Casslén, B. High tumor tissue concentration of plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) is an independent marker for shorter

- progression-free survival in patients with early stage endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2002. 97(3). p. 379-385.
58. Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P.M., Hayes, M.M., Gelmon, K.A. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010. 11(2). p. 174-183.
  59. Yang, C., Zhang, J., Ding, M., Xu, K., Li, L., Mao, L., Zheng, J. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2018. 20(5). p. 570-575.
  60. Folescu, R., Levai, C.M., Grigoraş, M.L., Arghirescu, T.S., Talpoş, I.C., Gîndac, C.M., Zamfir, C.L., Poroch, V., Anghel, M.D. Expression and significance of Ki-67 in lung cancer. *Rom J Morphol Embryol*. 2018. 59(1). p. 227-233.
  61. Maia, R., Santos, G.A.D., Reis, S., Viana, N.I., Pimenta, R., Guimarães, V.R., Recuero, S., Romão, P., Leite, K.R.M., Srougi, M., Passerotti, C.C. Can we use Ki67 expression to predict prostate cancer aggressiveness? *Rev Col Bras Cir*. 2022. 49. p. e20223200.
  62. Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen und medizinischen Fachgesellschaften, S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 4.4. AWMF-Registernummer: 032-045OL, 2021. p. 111-126.
  63. Fasching, P.A., Heusinger, K., Haeberle, L., Niklos, M., Hein, A., Bayer, C.M., Rauh, C., Schulz-Wendtland, R., Bani, M.R., Schrauder, M., Kahmann, L., Lux, M.P., Strehl, J.D., Hartmann, A., Dimmler, A., Beckmann, M.W., Wachter, D.L. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011. 11. p. 486.
  64. Gupta, V., Ramalingam, K., Yasothkumar, D., Debnath, D., Sundar, V. Ki-67 Expression as a Prognostic Marker: A Comparative Immunohistochemical Analysis of Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cureus*. 2023. 15(5). p. e38941.
  65. Andrés-Sánchez, N., Fisher, D., Krasinska, L. Physiological functions and roles in cancer of the proliferation marker Ki-67. *J Cell Sci*. 2022. 135(11).
  66. Ciardiello, F., Ma, B. [EGF receptor blockade with monoclonal antibodies and so-called "small molecules"]. *Onkologie*. 2005. 28 Suppl 4. p. 18-24.
  67. Sigismund, S., Avanzato, D., Lanzetti, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol*. 2018. 12(1). p. 3-20.
  68. Liu, L., Chen, J., Cai, X., Yao, Z., Huang, J. Progress in targeted therapeutic drugs for oral squamous cell carcinoma. *Surg Oncol*. 2019. 31. p. 90-97.
  69. Picon, H., Guddati, A.K. Mechanisms of resistance in head and neck cancer. *Am J Cancer Res*. 2020. 10(9). p. 2742-2751.
  70. Cívico-Ortega, J.L., González-Ruiz, I., Ramos-García, P., Cruz-Granados, D., Samayoá-Descamps, V., González-Moles, M. Prognostic and Clinicopathological Significance of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma: Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2023. 24(15).
  71. Nakamura, H., Tamaki, S., Yagyuu, T., Yamakawa, N., Hatake, K., Kirita, T. Relationship Between EGFR Expression in Oral Cancer Cell Lines and Cetuximab Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity. *Anticancer Res*. 2019. 39(3). p. 1275-

72. Rahman, A.F., Korashy, H.M., Kassem, M.G. Gefitinib. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. 2014. 39. p. 239-264.
73. Ang, K.K., Berkey, B.A., Tu, X., Zhang, H.Z., Katz, R., Hammond, E.H., Fu, K.K., Milas, L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. Cancer Res. 2002. 62(24). p. 7350-7356.
74. Charlson, M.E., Pompei, P., Ales, K.L., MacKenzie, C.R. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. J Chronic Dis. 1987. 40(5). p. 373-383.
75. Ribbat-Idel, J., Dressler, F.F., Krupar, R., Watermann, C., Paulsen, F.O., Kuppler, P., Klapper, L., Offermann, A., Wollenberg, B., Rades, D., Laban, S., Reischl, M., Bruchhage, K.L., Idel, C., Perner, S. Performance of Different Diagnostic PD-L1 Clones in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Front Med (Lausanne). 2021. 8. p. 640515.
76. Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., Salto-Tellez, M., Hamilton, P.W. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. Scientific Reports. 2017. 7(1). p. 16878.
77. Ram, S., Vizcarra, P., Whalen, P., Deng, S., Painter, C.L., Jackson-Fisher, A., Pirie-Shepherd, S., Xia, X., Powell, E.L. Pixelwise H-score: A novel digital image analysis-based metric to quantify membrane biomarker expression from immunohistochemistry images. PLoS One. 2021. 16(9). p. e0245638.
78. Byars, L.T. Surgical management of mandible invaded by oral cancer. Surg Gynecol Obstet. 1954. 98(5). p. 564-570.
79. Carpenter, D.J., Mowery, Y.M., Broadwater, G., Rodrigues, A., Wisdom, A.J., Dorth, J.A., Patel, P.R., Shortell, C.K., Clough, R., Brizel, D.M. The risk of carotid stenosis in head and neck cancer patients after radiation therapy. Oral Oncol. 2018. 80. p. 9-15.
80. Hartner, L. Chemotherapy for Oral Cancer. Dent Clin North Am. 2018. 62(1). p. 87-97.
81. Liu, C., Wang, M., Zhang, H., Li, C., Zhang, T., Liu, H., Zhu, S., Chen, J. Tumor microenvironment and immunotherapy of oral cancer. Eur J Med Res. 2022. 27(1). p. 198.
82. McNutt, M. Cancer immunotherapy. Science. 2013. 342(6165). p. 1417.
83. Concu, R., Cordeiro, M. Cetuximab and the Head and Neck Squamous Cell Cancer. Curr Top Med Chem. 2018. 18(3). p. 192-198.
84. Kwok, G., Yau, T.C., Chiu, J.W., Tse, E., Kwong, Y.L. Pembrolizumab (Keytruda). Hum Vaccin Immunother. 2016. 12(11). p. 2777-2789.
85. Burtneß, B., Harrington, K.J., Greil, R., Soulières, D., Tahara, M., de Castro, G., Jr., Psyrri, A., Basté, N., Neupane, P., Bratland, Å., Fuehrer, T., Hughes, B.G.M., Mesía, R., Ngamphaiboon, N., Rordorf, T., Wan Ishak, W.Z., Hong, R.L., González Mendoza, R., Roy, A., Zhang, Y., Gumuscu, B., Cheng, J.D., Jin, F., Rischin, D. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or

- metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019. 394(10212). p. 1915-1928.
86. Schroder, W.A., Major, L., Suhrbier, A. The role of SerpinB2 in immunity. *Crit Rev Immunol*. 2011. 31(1). p. 15-30.
  87. Katsikis, J., Yu, H., Maurer, F., Medcalf, R. The molecular basis for the aberrant production of plasminogen activator inhibitor type 2 in THP-1 monocytes. *Thromb Haemost*. 2000. 84(3). p. 468-473.
  88. Hildenbrand, R., Allgayer, H., Marx, A., Stroebel, P. Modulators of the urokinase-type plasminogen activation system for cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010. 19(5). p. 641-652.
  89. Laug, W.E., Cao, X.R., Yu, Y.B., Shimada, H., Kruithof, E.K. Inhibition of invasion of HT1080 sarcoma cells expressing recombinant plasminogen activator inhibitor 2. *Cancer Res*. 1993. 53(24). p. 6051-6057.
  90. Praus, M., Wauterickx, K., Collen, D., Gerard, R.D. Reduction of tumor cell migration and metastasis by adenoviral gene transfer of plasminogen activator inhibitors. *Gene Ther*. 1999. 6(2). p. 227-236.
  91. Mueller, B.M., Yu, Y.B., Laug, W.E. Overexpression of plasminogen activator inhibitor 2 in human melanoma cells inhibits spontaneous metastasis in scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92(1). p. 205-209.
  92. Baker, E.A., Leaper, D.J., Hayter, J.P., Dickenson, A.J. Plasminogen activator system in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2007. 45(8). p. 623-627.
  93. Murdoch, D. Standard, and novel cytotoxic and molecular-targeted, therapies for HNSCC: an evidence-based review. *Curr Opin Oncol*. 2007. 19(3). p. 216-221.
  94. Colevas, A.D. Chemotherapy options for patients with metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*. 2006. 24(17). p. 2644-2652.
  95. Huang, Z., Li, H., Huang, Q., Chen, D., Han, J., Wang, L., Pan, C., Chen, W., House, M.G., Nephew, K.P., Guo, Z. SERPINB2 down-regulation contributes to chemoresistance in head and neck cancer. *Mol Carcinog*. 2014. 53(10). p. 777-786.
  96. Menon, S.S., Guruvayoorappan, C., Sakthivel, K.M., Rasmi, R.R. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta*. 2019. 491. p. 39-45.
  97. Rebaudi, F., De Rosa, A., Greppi, M., Pistilli, R., Pucci, R., Govoni, F.A., Iacoviello, P., Broccolo, F., Tomasello, G., Pesce, S., Laganà, F., Bianchi, B., Di Gaudio, F., Rebaudi, A., Marcenaro, E. A new method for oral cancer biomarkers detection with a non-invasive cyto-salivary sampling and rapid-highly sensitive ELISA immunoassay: a pilot study in humans. *Front Immunol*. 2023. 14. p. 1216107.
  98. Dai, W., Li, Y., Zhou, Q., Xu, Z., Sun, C., Tan, X., Lu, L. Cetuximab inhibits oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis via degradation of epidermal growth factor receptor. *J Oral Pathol Med*. 2014. 43(4). p. 250-257.
  99. Ribeiro, F.A., Noguti, J., Oshima, C.T., Ribeiro, D.A. Effective targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR) for treating oral cancer: a promising approach. *Anticancer Res*. 2014. 34(4). p. 1547-1552.

100. Wen, Z., Luo, D., Wang, S., Rong, R., Evers, B.M., Jia, L., Fang, Y., Daoud, E.V., Yang, S., Gu, Z., Arner, E.N., Lewis, C.M., Solis Soto, L.M., Fujimoto, J., Behrens, C., Wistuba, II, Yang, D.M., Brekken, R.A., O'Donnell, K.A., Xie, Y., Xiao, G. Deep Learning-Based H-Score Quantification of Immunohistochemistry-Stained Images. *Mod Pathol.* 2024. 37(2). p. 100398.
101. Naruse, T., Yanamoto, S., Matsushita, Y., Sakamoto, Y., Morishita, K., Ohba, S., Shiraishi, T., Yamada, S.I., Asahina, I., Umeda, M. Cetuximab for the treatment of locally advanced and recurrent/metastatic oral cancer: An investigation of distant metastasis. *Mol Clin Oncol.* 2016. 5(2). p. 246-252.
102. Vermorken, J.B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H.R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N., Hitt, R. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008. 359(11). p. 1116-1127.
103. Moral, M., Paramio, J.M. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. *Histol Histopathol.* 2008. 23(10). p. 1269-1278.
104. Bos, T., Ratti, J.A., Harada, H. Targeting Stress-Response Pathways and Therapeutic Resistance in Head and Neck Cancer. *Front Oral Health.* 2021. 2. p. 676643.
105. Licitra, L., Mesia, R., Rivera, F., Remenár, É., Hitt, R., Erfán, J., Rottey, S., Kawecki, A., Zabolotnyy, D., Benasso, M., Störkel, S., Senger, S., Stroh, C., Vermorken, J.B. Evaluation of EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy in the first-line treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: EXTREME study. *Ann Oncol.* 2011. 22(5). p. 1078-1087.
106. Vermorken, J.B., Psyrri, A., Mesía, R., Peyrade, F., Beier, F., de Blas, B., Celik, I., Licitra, L. Impact of tumor HPV status on outcome in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck receiving chemotherapy with or without cetuximab: retrospective analysis of the phase III EXTREME trial. *Ann Oncol.* 2014. 25(4). p. 801-807.

## VI. Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen beteiligten Personen für die Hilfe und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertationsschrift bedanken.

Zuallererst gilt ein besonderer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Samer Hakim für die außergewöhnlich gute menschliche und fachliche Betreuung. Seine konstruktive Kritik, seine Geduld, seine stete Präsenz und schnelle Verfügbarkeit für jedwede Frage haben es mir ermöglicht diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Außerdem möchte ich mich herzlich bedanken bei Prof. Dr. Dr. Sieg, dass ich an seiner Klinik promovieren durfte. Durch ihn habe ich bereits seit Beginn meines Studiums eine immer weiterwachsende Begeisterung für den Fachbereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie entdecken dürfen, welche ich durch diese Promotionsarbeit und durch meine Arbeit an seiner Klinik entfalten kann.

Für die Unterstützung bei der Auswertung der histopathologischen Präparate und die Bereitstellung des technischen Equipments möchte ich mich bei den Mitarbeitenden des Instituts für Pathologie des UKSH, Campus Lübeck, bedanken. Hierbei gilt mein Dank insbesondere Dr. Julika Ribbat-Idel.

Auch danke ich Dr. Ubai Alsharif aus dem Klinikum Dortmund für die Unterstützung bei der statistischen Interpretation.

Besonders möchte ich mich auch bedanken bei Dr. Mohamed Falougy, mit dem ich gemeinsam an diesem Projekt arbeiten durfte. Er hat mich stets unterstützt und motiviert und dank der Zusammenarbeit mit ihm habe ich diese Dissertation mit Ausdauer und Freude erarbeiten können.

Ich bedanke mich auch bei all meinen Freunden. Insbesondere gilt mein Dank Ioana Geisler, mit der ich gemeinsam Ärztin werden durfte und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Widmen möchte ich die Arbeit meiner Familie, meinen Eltern und meinen fünf Geschwistern, die nie von meiner Seite gewichen sind. Ohne ihre Unterstützung und Förderung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.