



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

**Prognostische Relevanz der SOX2- und NANOG Expression beim rezidivierenden
Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde (Dr. med. dent.)
der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –
vorgelegt von

Dr. med. Mohamed Falougy
aus Ägypten

Lübeck, 2026

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Samer Hakim

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Henning Frenzel

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2026

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.03.2026

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	8
1.1	Kopf- und Hals-Tumoren.....	8
1.2	Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle	8
1.2.1	Epidemiologie und Risikofaktoren	8
1.2.2	Molekulare Pathogenese und typische genetische Veränderungen	10
1.2.3	Klinische Präsentation, Diagnostik und Therapie.....	11
1.3	Rezidivierendes orales Plattenepithelkarzinom	15
1.3.1	Risikofaktoren für das Rezidiv bei oralen Plattenepithelkarzinomen	15
1.3.2	Biologische Grundlagen der Metastasierung und „Field Cancerization“	15
1.3.3	Molekulare Abgrenzung von Tumorrezidiven und sekundären Primärkarzinomen beim oralen Plattenepithelkarzinom	17
1.4	Krebsstammzellen im oralen Plattenepithelkarzinom	20
1.4.1	Rolle von SOX2 im oralen Plattenepithelkarzinom	23
1.4.2	Rolle von NANOG im oralen Plattenepithelkarzinom	24
1.4.3	Zusammenhang von SOX2/NANOG-Expression mit Therapieresistenz und Prognose..	26
1.5	Ziel der Studie	26
2.	Methoden.....	27
2.1	Patientenkohorte.....	27
2.2	Tissue Microarray und Immunhistochemische Färbung	29
2.3	Statistische Analyse	34
2.4	Ethik	37
3.	Ergebnisse	38
3.1	Demografische und klinische Basisdaten	38
3.2	Überlebensergebnisse in Abhängigkeit von der SOX2-Expression.....	40
3.3	Überlebensergebnisse in Abhängigkeit von der NANOG-Expression.....	41
3.4	Multivariate Cox-Regression zur Risikobewertung auf Basis des SOX2-H-Scores	42
3.5	Multivariate Cox-Regression zur Risikobewertung auf Basis des NANOG-H-Scores	43
3.6	SOX2-Expression in Primärtumoren vs. Rezidiven.....	44
3.7	NANOG-Expression in Primärtumoren vs. Rezidiven.....	45
3.8	Kaplan-Meier-Analyse zur Analyse des prOS und prDFS für SOX2 und NANOG	48
3.9	Zusammenfassende Betrachtung	52
4.	Diskussion.....	53

4.1	Prognostische Bedeutung von SOX2 beim rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom	55
4.2	Prognostische Bedeutung von NANOG beim rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom	59
4.3	Diskrepanz in der Literatur und Meta-Analysen.....	62
4.4	NANOG und SOX2 in der Therapieresistenz	63
5.	Zusammenfassung.....	66
6.	Literaturverzeichnis.....	67
7.	Danksagungen	81

Liste der Abkürzungen

ABCG2	ATP-Binding Cassette Sub-Family G Member 2
AKT	Protein kinase B (ein zentraler Signaltransduktionsfaktor)
ALDH1 / ALDH1A1	Aldehyddehydrogenase 1
aOR	adjusted Odds Ratio
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
CAL27	Zelllinie oraler Plattenepithelkarzinome
CASP8	Caspase 8
CD44	Cluster of Differentiation 44
CD133	Cluster of Differentiation 133
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A
CI	Konfidenzintervall
COL4A1	Collagen Type IV Alpha 1 Chain
CPS	Combined Positive Score (bei PD-L1-Testung)
CT	Computertomografie
c-Myc	cellular Myelocytomatosis oncogene
Cyclin D1	Zellzyklus-Regulatorprotein, fördert den Übergang von G1- in S-Phase
DAB	3',3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ESCs	Embryonale Stammzellen
EXTREME	Kombinationstherapie bei fortgeschrittenem HNSCC: Cetuximab + Platin (Cisplatin/Carboplatin) + 5-FU – benannt nach der EXTREME-Studie
FDG	Fluorodeoxyglucose
FHIT	Fragile Histidine Triad
5-FU	5-Fluorouracil

G	Grading
GST	Glutathion-S-Transferase
Gy	Gray
H-Score	Histochemical scoring assessment
HIF / HIF1 α	Hypoxia-Inducible Factor
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Human Papillomavirus
HR	Hazard Ratio
IHC	Immunhistochemie
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
IQR	Interquartilsabstand
LOH	Loss of Heterozygosity
miR-107	microRNA-107
miRNA	microRNA
MMP / MMP9 / MMP1	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomografie
MYC / c-MYC	Myelocytomatosis Oncogen
NANOG	Homöobox-Transkriptionsfaktor NANOG
Nanogp8	NANOG homeobox pseudogene 8
NCCIT	Human pluripotent embryonal carcinoma cells (Zelllinie)
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NNN	N'-Nitrosonornicotine
NOTCH1	Neurogenes Locus Notch Homolog Protein 1
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
OR	Odds Ratio
OS	Overall Survival (Gesamtüberleben)
OSCC	Oral Squamous Cell Carcinoma (orales Plattenepithelkarzinom)
p53	Tumorsuppressorgen p53
PD / PD-1 / PD-L1	Programmed Death / Programmed Death Receptor / Ligand

PET	Positronenemissionstomografie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase, katalytische Untereinheit alpha
PTH1H	Parathyroid Hormone-Like Hormone
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
pre-miR-107	precursor microRNA-107
prOS	Gesamtüberleben nach Rezidiv (post-recurrence Overall Survival)
prDFS	krankheitsfreies Überleben nach Rezidiv (post-recurrence Disease-Free Survival)
QuPath	Software zur digitalen Pathologieauswertung
R-Status	Resektionsstatus
RB / RB1	Retinoblastoma Gen
RNA	Ribonukleinsäure
rT / rN / rM	Rezidiv-Tumorstadium, -Lymphknotenstatus, -Metastasierung
DFS	Disease-Free Survival (krankheitsfreies Überleben)
S3-Leitlinie	evidenz- und konsensusbasierte Leitlinie höchster Qualität
SFT	Second Field Tumors
SLUG (SNAI2)	Transkriptionsfaktor SLUG
SNAIL (SNAI1)	Transkriptionsfaktor SNAIL
SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2
TP53	Tumor Protein 53 Gen
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumor-Node-Metastasis Klassifikation
TSN	Tobacco-Specific Nitrosamines
TSG	Tumorsuppressorgen
TWIST	Transkriptionsfaktor TWIST
UICC	Union for International Cancer Control
UMSCC74A	Zelllinie oraler Plattenepithelkarzinome
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

1.1 Kopf- und Hals-Tumoren

Kopf- und Hals-Tumoren sind die sechsthäufigste Krebsart weltweit, mit über 870.000 Neuerkrankungen und 440.000 Todesfällen im Jahr 2020 [1]. Das Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses (HNSCC, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) ist die häufigste Form von Kopf-Hals-Tumoren, macht etwa 90 % der Kopf-Hals-Tumoren-Fälle aus und geht in erster Linie vom Schleimhautepithel der Mundhöhle, des Rachens und des Kehlkopfes aus [2]. Die Inzidenz von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen nimmt zu und es wird prognostiziert, dass sie bis 2030 auf 1,08 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr ansteigen wird [3; 4].

1.2 Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

An 16. Stelle der häufigsten Krebsarten weltweit stehen Mundhöhlen- und Lippenkarzinome [5]. Jedes Jahr werden schätzungsweise über 400.000 neue Fälle von Mundkrebs weltweit diagnostiziert, zwei Drittel davon in asiatischen Ländern [6]. Zudem handelt es sich bei Mundhöhlenkrebs in mehr als 90 % der Fälle um ein Plattenepithelkarzinom [7].

Gemäß Angaben des Krebsregisterzentrums und des Robert Koch-Instituts erkranken Männer in Deutschland häufiger und durchschnittlich zwei bis drei Jahre früher als Frauen. Männer sind am häufigsten von Tumoren des Oropharynx betroffen, wohingegen Frauen überwiegend Neubildungen in der Mundhöhle und an der Lippe aufweisen. Die altersstandardisierten Raten für Erkrankungen haben bei beiden Geschlechtern von 1999 bis 2011 zugenommen. Seit dem Jahr 2011 zeigen die Raten bei Frauen eine nahezu konstante Entwicklung, während bei Männern sogar ein Abwärtstrend erkennbar ist. Die Mortalitätsraten verzeichnen bei Männern über den gesamten Zeitraum einen leichten Rückgang, während sie bei Frauen nahezu konstant bleiben [8].

Tabakkonsum ist nach wie vor das größte Krebsrisiko, da dieser für Millionen von Krebstodesfällen pro Jahr verantwortlich ist. Zu den durch Rauchen verursachten neoplastischen Erkrankungen gehören Krebserkrankungen der Lunge, der Mundhöhle, des

Rachens, des Kehlkopfs, der Speiseröhre, der Harnblase, der Nieren, des Beckens und der Bauchspeicheldrüse. Der Zusammenhang zwischen Rauchen und Mundhöhlenkrebs wurde durch epidemiologische Studien eindeutig nachgewiesen [9; 10]. Zu den wichtigsten Karzinogenen im Tabakrauch zählen der aromatische Kohlenwasserstoff Benzpyren und die tabakspezifischen Nitrosamine (TSN) 4-(Nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und N'-Nitrosornicotin (NNN). Tierversuche haben gezeigt, dass NNK und NNN in den Tabakerzeugnissen Tumore in der Mundhöhle, der Lunge, der Speiseröhre und der Bauchspeicheldrüse verursachen. NNK, NNN und ihre Metaboliten binden sich kovalent an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) von Keratinozyten-Stammzellen und bilden DNA-Addukte [2], die für kritische Mutationen bei der DNA-Replikation verantwortlich sind. Der Stoffwechsel dieser Karzinogene umfasst die Oxygenierung durch P450-Enzyme in Cytochromen und die Konjugation durch Glutathion-S-Transferase (GST) [11; 12]. Es wird vermutet, dass genetische Polymorphismen in den Genen, die für diese Enzyme kodieren, eine Schlüsselrolle bei der genetischen Prädisposition tabakbedingter Kopf- und Hals-Tumore spielen [13]. Der Konsum von Tabak-Quid ist mit einem sechsfach erhöhten Risiko für die Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen assoziiert [14].

Gemäß epidemiologischen Studien steigert der Alkoholkonsum die Inzidenz von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen dosisabhängig. Die gesundheitlichen Konsequenzen von Ethanolkonsum manifestieren sich in zwei Aspekten: Erstens können zeitliche Konsummuster wie das Alter bei Konsumbeginn und die Konsumdauer den Zusammenhang zwischen Trinkintensität und dem Krebsrisiko beeinflussen und zweitens die Menge des konsumierten Alkohols [15]. Trotz der Unsicherheit hinsichtlich der Art und Weise, wie Alkohol zur Entstehung oraler Karzinome beiträgt, sind zahlreiche Mechanismen diskutiert worden. Ethanol wird zunächst in Acetaldehyd, ein bekanntes Karzinogen, umgewandelt. Anhaltender Alkoholkonsum begünstigt die Entstehung von Mundkrebs, da Acetaldehyd als Tumorauslöser fungiert [16]. Laut früheren Untersuchungen führt Alkoholkonsum dazu, die Mundschleimhaut durchlässiger zu machen, was letztendlich zu einer Atrophie des Epithels führt. Des Weiteren fördert Alkohol den Abbau der Lipidstruktur der Epithelzellmembran der Mundschleimhaut, was das Eindringen von Karzinogenen begünstigt [17]. Die Herstellung von Acetaldehyd wurde

mit verschiedenen Streptococcus- und Neisseria-Spezies sowie weiteren Bakterien assoziiert. Es wurde festgestellt, dass sich derartige Bakterien bei Rauchern und starken Alkoholkonsumenten vermehren. Angesichts der Fähigkeit dieser Bakterien, Ethanol zum Karzinogen Acetaldehyd umzuwandeln, sind sie mit einem erhöhten Risiko für das Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom verbunden [18].

In den letzten Jahren ist deutlich geworden, dass humane Papillomviren (HPV) nicht nur Genital- und Analkarzinome verursachen, sondern auch eine ätiologische Ursache für eine Untergruppe der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome darstellen. Es gibt stichhaltige Hinweise darauf, dass sowohl Inzidenz als auch Prävalenz von HPV-assoziierten Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen zunehmen, wobei insbesondere ein Zusammenhang mit dem Rückgang von Rauchgewohnheiten diskutiert wird [19; 20]. Veröffentlichungen in den letzten Jahren zeigten eine erhöhte Inzidenz von HPV-Infektionen bei diesen Karzinomen von etwa 50 % [21; 22], wobei in der Mehrzahl ($\approx 87\%$) dieser Fälle und damit am häufigsten HPV16 auftrat [23]. Während die meisten HPV-bedingten Kopf-Hals-Karzinome oropharyngeale Plattenepithelkarzinome sind, die vor allem die Tonsillen und den Zungengrund betreffen [24; 25], wird derzeit diskutiert, ob HPV auch bei anderen Subtypen der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome eine Rolle spielen könnte. Es wird angenommen, dass der p53-Polymorphismus (Arg72Pro) die Anfälligkeit für orale Karzinome bei gleichzeitiger HPV-Infektion erhöht [26].

Orale Erythroplakien und Leukoplakien weisen eine hohe Rate maligner Transformationen auf und gelten als die häufigsten Erkrankungen der Mundschleimhaut [27]. Angesichts der dargestellten Risikofaktoren stellt sich die Frage, welche molekularen Veränderungen sie in den Zellen bewirken. Im folgenden Abschnitt wird daher die molekulare Pathogenese oraler Plattenepithelkarzinome mit ihren typischen genetischen Veränderungen beleuchtet.

1.2.2 Molekulare Pathogenese und typische genetische Veränderungen

Genetische Veränderungen entstehen bei oralen Karzinomen entweder durch dominante oder rezessive Veränderungen. Bei dominanten Veränderungen sind überwiegend Protoonkogene und bestimmte Tumorsuppressorgene (TSGs) betroffen, während bei rezessiven

Veränderungen Gene aus wachstumshemmenden Signalwegen oder häufige TSGs durch Funktionsgewinn bzw. -verlust verändert werden [28]. Exogene karzinogene Faktoren fördern die Krebsentstehung, indem sie DNA-Schäden verursachen [29] und Tumorsuppressorgene (TSGs) inaktivieren [30].

Eine spezifische Art von Genvariationen, die die DNA-Reparatur, Immortalisierung, Apoptose, Proliferation, Invasion, Wachstumsfaktorrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Angiogenese und Signaltransduktion betreffen, unterscheidet krebsartige von normalen epithelialen Zellen des oberen Aerodigestivtrakts [31]. Diese genetischen Variationen entstehen durch verschiedene Störungen in normalen genetischen Prozessen [32]. Neben genetischen Veränderungen spielen auch epigenetische Modifikationen wie DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und RNA-vermittelte Gen-Silencing-Mechanismen (z. B. durch miRNAs) eine Rolle bei der Entstehung von oralen Karzinomen [33].

1.2.3 Klinische Präsentation, Diagnostik und Therapie

Das klinische Bild des oralen Plattenepithelkarzinoms ist in fortgeschrittenen Stadien so charakteristisch, dass in der Regel ein eindeutiger Verdacht auf eine maligne Erkrankung besteht [34]. In frühen Stadien hingegen ist eine Fehldiagnose durchaus möglich [35]. Daher ist es stets erforderlich, die Diagnose durch eine Biopsie und histopathologische Untersuchung abzusichern [36; 37], da die klinischen Merkmale allein nicht ausreichen. Mitunter können sich Patienten ausschließlich mit einer zervikalen Lymphadenopathie vorstellen, ohne dass weitere Symptome auftreten. In den Endstadien der Erkrankung können Hautfisteln, Blutungen, ausgeprägte Anämie und Kachexie auftreten [38].

Eine Studie zeigte, dass bei 342 (52,6 %) der untersuchten Fälle mit oralem Plattenepithelkarzinom Schwellungen und/oder Schmerzen die ersten klinischen Anzeichen waren [39]. Andere Studien beschreiben Ulzerationen und Schwellungen als häufigste Symptome [40], gefolgt von Schmerzen, Blutungen, eingeschränkter Zungenbeweglichkeit, Dysphagie und Parästhesien [41].

In der Frühphase präsentieren sich orale Karzinome häufig als erythroleukoplastische Veränderungen, also als Läsionen mit kombinierten weißlichen und rötlichen Bereichen [42].

Im fortgeschrittenen Stadium weisen orale Karzinome typischerweise Ulzerationen, knotige Verhärtungen sowie eine Fixierung an das umliegende Gewebe auf [43; 44; 45; 46].

Die Diagnostik von Karzinomen der Mundhöhle erfordert ein systematisches und interdisziplinär abgestimmtes Vorgehen. Bei persistierenden, unklaren Schleimhautveränderungen über einen Zeitraum von mehr als zwei Wochen ist eine umgehende Überweisung an ein spezialisiertes Zentrum indiziert. Eine vollständige Inspektion der Mundschleimhaut sollte integraler Bestandteil jeder ärztlichen oder zahnärztlichen Untersuchung sein [47]. Zur Beurteilung der lokalen Tumorausdehnung gelten bildgebende Schnittverfahren wie die Computertomografie (CT) oder Magnetresonanztomografie (MRT) als diagnostischer Standard in den S3-Leitlinien. Die Tumorbiopsie sollte grundsätzlich erst nach Abschluss der bildgebenden Diagnostik erfolgen, um eine mögliche Beeinträchtigung der Kontrastmittelaufnahme zu vermeiden [47].

Für das zervikale Lymphknoten-Staging wird die Durchführung einer CT oder MRT vom Schädelbasisbereich bis zur oberen Thoraxapertur empfohlen. Bei fortgeschrittenem Tumorstadium (Stadium III/IV) ist eine ergänzende FDG-PET/CT zur Erfassung potenzieller Fernmetastasen oder Zweitmalignome durchzuführen. Zusätzlich wird bei fortgeschrittenen Primärtumoren ein CT des Thorax zur Detektion pulmonaler Metastasen empfohlen [47].

Das Tumor-Staging erfolgt gemäß der TNM-Klassifikation der UICC. Neben der lokalen Tumorausdehnung (T), dem Lymphknotenstatus (N) und dem Vorliegen von Fernmetastasen (M) sollten weitere prognostisch relevante Faktoren wie der Resektionsrandstatus (R), das histologische Grading (G), perineurale Invasion (Pn) sowie lymph- (L) oder gefäßinvasive Tumorausbreitung (V) berücksichtigt werden [48].

Die primäre Therapie des Mundhöhlenkarzinoms besteht – soweit möglich – in der chirurgischen Entfernung des Tumors im Gesunden (R0-Resektion) [49; 50]. Die Operation ist bei lokal begrenzten Tumoren kurativ, d.h. auf Heilung abzielend und erzielt die höchsten Erfolgschancen, sofern der Tumor vollständig mit adäquatem Sicherheitsabstand entfernt wird. Abhängig von Tumorgröße und -lokalisierung kann die Resektion von Teilen der Zunge, Mundboden, Wange, Gaumen oder Kieferknochen erforderlich sein. Wichtig ist eine

histologisch freie Resektionsrandbreite (idealerweise ≥ 5 mm) [51; 52], da geringere Abstände mit höheren Lokalrezidivraten assoziiert sind. Intraoperativ werden oft Schnellschnitt-Untersuchungen durchgeführt, um die Resektionsränder auf Tumorfreiheit zu überprüfen [52; 53]. Bereits bei der Erstoperation muss auch die Behandlung des Halses berücksichtigt werden. Die regionäre Lymphknotenmetastasierung ist der prognostisch bedeutsamste Faktor beim Mundhöhlenkarzinom [54]. Zur Therapie des Halses ist bei Vorliegen von klinisch erkennbaren Lymphknotenmetastasen (cN+) eine Halsauräumung indiziert. Bei klinisch unauffälligem Hals (cN0) hat sich gezeigt, dass ein prophylaktisches Entfernen der regionären Lymphknoten die Überlebenschancen signifikant verbessert. In einer prospektiv-randomisierten Studie aus Indien führte eine sofortige selektive Neck Dissection bei frühen Mundhöhlentumoren (T1–T2, cN0) zu einer um 12,5 % höheren Gesamtüberlebensrate im Vergleich zu einem abwartenden Vorgehen mit spätem Eingreifen erst bei Lymphknotenrezidiv [55].

Die postoperative Radiotherapie stellt eine wesentliche Säule der adjuvanten Behandlung bei lokal fortgeschrittenen Mundhöhlenkarzinomen dar. Ihre Anwendung ist insbesondere bei Patienten mit T3 oder T4 Tumoren, positiven oder knappen Resektionsrändern (close margin), perineuraler oder vaskulärer Infiltration sowie nachgewiesener Lymphknotenmetastasierung indiziert. Ziel ist die Reduktion des Risikos lokoregionärer Rezidive und die Verbesserung der krankheitsspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit [47; 56; 57].

Abhängig von der prognostischen Risikokonstellation variiert das empfohlene Bestrahlungsschema. Je nach Tumorgöße, -lokalisation wird eine Gesamtdosis von 54 bis 60 Gy in konventioneller Fraktionierung über etwa sechs Wochen verabreicht. In Hochrisikosituationen – beispielsweise bei R1-Resektion oder extranodalem Tumorwachstum – sollte die Strahlentherapie mit 66 Gy durchgeführt werden. Es wird empfohlen, die postoperative Radiotherapie zeitnah zu beginnen und innerhalb von elf Wochen nach der chirurgischen Resektion abzuschließen, um negative Effekte auf die Tumorkontrolle zu vermeiden [47]. In Fällen nicht resektabler Tumoren, bei denen eine kurative Operation ausgeschlossen ist, stellt die primäre Radiochemotherapie die bevorzugte Behandlungsoption dar. Die kombinierte Radiochemotherapie hat sich gegenüber der alleinigen Bestrahlung als überlegen in Bezug auf Tumorkontrolle und Überleben erwiesen. Als Standard-

Chemotherapeutikum wird Cisplatin oder Carboplatin verwendet, alternativ kann bei Kontraindikationen eine Therapie mit Cetuximab erwogen werden [47].

Die Immuntherapie nutzt immunologische Ansätze, um gezielt die körpereigene Abwehr gegen Tumorzellen zu stärken [58; 59]. Zwei PD-1-Inhibitoren – Nivolumab und Pembrolizumab – wurden in den letzten Jahren für Patienten mit rezidivierendem oder metastasiertem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle zugelassen [60; 61]. Diese Behandlungsform führt zwar in Einzelfällen zu langanhaltenden Remissionen, jedoch spricht bislang nur eine begrenzte Anzahl von Patienten darauf an [62]. Bei Patienten mit einem rezidivierenden oder metastasierten Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, für die eine kurative lokale Therapie nicht mehr in Frage kommt, stellt die Immuntherapie eine systemische Behandlungsoption dar. Die Wahl des therapeutischen Ansatzes orientiert sich insbesondere an der Expression von PD-L1 auf Tumor- und Immunzellen, die durch den so-genannten Combined Positive Score (CPS) quantifiziert wird [47].

Liegt eine PD-L1-Expression mit einem $CPS \geq 1$ vor, soll gemäß S3-Leitlinie eine Erstlinientherapie mit dem PD-1-Antikörper Pembrolizumab entweder als Monotherapie oder in Kombination mit Platin und 5-Fluorouracil (5-FU) durchgeführt werden. Diese Empfehlung basiert auf den Ergebnissen der KEYNOTE-048-Studie [61], in der eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens bei entsprechend selektionierten Patienten nachgewiesen wurde [47; 61].

Für Patienten mit $CPS < 1$ oder in Situationen, in denen Pembrolizumab nicht indiziert ist, soll alternativ das sogenannte EXTREME-Schema angewendet werden [63]. Dieses besteht aus einer Kombinationstherapie mit Cetuximab, Platin (Cisplatin oder Carboplatin) und 5-FU [63]. Die Anwendung dieser Regime erfolgt jeweils für vier bis sechs Zyklen. Im Anschluss daran sollte bei nicht progredientem Krankheitsverlauf eine Erhaltungstherapie durchgeführt werden. Patienten mit positiver PD-L1-Expression erhalten weiterhin Pembrolizumab, während Patienten mit $CPS < 1$ Cetuximab erhalten sollen [47; 63].

Bei Krankheitsprogression nach einer platinhaltigen Erstlinientherapie mit Cetuximab kann in der Zweitlinie ein Checkpoint-Inhibitor wie Pembrolizumab oder Nivolumab zum Einsatz

kommen, sofern eine entsprechende Zulassung besteht. Falls bereits in der Erstlinie eine Pembrolizumab-haltige Kombinationstherapie verabreicht wurde, kann in der zweiten Therapielinie eine Chemotherapie mit Taxanen (z. B. Docetaxel) – gegebenenfalls in Kombination mit Cetuximab – erwogen werden. Nach Versagen einer Pembrolizumab-Monotherapie besteht die Möglichkeit einer Zweitlinientherapie mit Platin/5-FU und Cetuximab [47; 64].

Die Kombination mehrerer Immuncheckpoint-Inhibitoren außerhalb klinischer Studien wird in der S3-Leitlinie derzeit nicht empfohlen. Die onkologische Verlaufsbeurteilung sollte mittels bildgebender Verfahren wie CT in regelmäßigen Abständen von sechs bis zwölf Wochen erfolgen, angepasst an die Dynamik der Erkrankung und die Therapielinie [47].

1.3 Rezidivierendes orales Plattenepithelkarzinom

1.3.1 Risikofaktoren für das Rezidiv bei oralen Plattenepithelkarzinomen

Das Rezidiv eines Tumors nach erfolgreicher Primärtherapie stellt eine Herausforderung in der Behandlung oraler Plattenepithelkarzinome dar. Die Identifikation relevanter Risikofaktoren ist essenziell, um Überlebensraten zu verbessern, eine gezielte Nachsorge zu etablieren und individualisierte Therapiekonzepte zu entwickeln [65].

Eine retrospektive Kohortenstudie mit 173 Patienten zeigte, dass das männliche Geschlecht mit einem signifikant erhöhten Rezidivrisiko assoziiert war (OR = 3,79). Auch das Vorhandensein zervikaler Lymphknotenmetastasen erwies sich als signifikanter Risikofaktor (OR = 4,48) [66].

In Übereinstimmung mit früheren Studien korrelierten jedoch positive Resektionsränder, ein fortgeschrittenes Tumorstadium (T3/T4) sowie multiple befallene Lymphknoten mit einem erhöhten Risiko für Tumorrezidive [67; 68; 69; 70; 71].

1.3.2 Biologische Grundlagen der Metastasierung und „Field Cancerization“

Die Entstehung oraler Plattenepithelkarzinome wird häufig auf adulte Epithel-Stammzellen oder Vorläuferzellen zurückgeführt, die nach onkogener Umwandlung zu Krebsstammzellen differenzieren. Diese zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Initiierung

von Tumoren aus [43]. Trotz ihres geringen Anteils im Tumor (1–3 %) gelten sie aufgrund ihrer Therapieresistenz als bedeutende Treiber der Metastasierung [72].

Zu den wichtigsten molekularen Markern der Krebsstammzellen zählen CD44, CD133 und ALDH1. CD44 fungiert als Rezeptor für Hyaluronsäure und interagiert mit Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), insbesondere MMP9. Die gemeinsame Expression beider Moleküle an der Tumorfront bedingen eine erhöhte Metastasierungswahrscheinlichkeit [73; 74; 75].

Ein zentraler Mechanismus der Tumorausbreitung ist die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), bei der Tumorzellen mesenchymale Merkmale wie Beweglichkeit und Invasivität annehmen. Dabei gehen E-Cadherin-Verluste mit Vimentin-Überexpression einher [76; 77]. Transkriptionsfaktoren wie TWIST, SNAIL und SLUG spielen bei der Regulation dieses Prozesses eine Schlüsselrolle und stehen mit aggressivem Wachstum und Metastasierung in Verbindung [78; 79].

Hypoxiebedingungen im Tumormikromilieu fördern die Bildung von HIF1 α , das nicht nur angiogene Faktoren induziert, sondern auch die EMT unterstützt und somit die Metastasierung begünstigt [77; 78; 80].

Teilweise EMT (p-EMT), ein Zwischenzustand zwischen epithelialelem und mesenchymalem Phänotyp, wird insbesondere am Rand des Tumors beobachtet. Diese Zellen zeigen metastatische Eigenschaften und stehen in engem Zusammenhang mit dem Tumorigradung [81; 82].

Ein weiteres zentrales Konzept ist die sogenannte „Field Cancerization“, die erstmals 1953 beschrieben wurde. Sie beschreibt prä-maligne molekulare Veränderungen in histologisch unauffälligem Gewebe rund um den Primärtumor [83]. Auch im metastasierten Stadium zeigen HPV-positive Tumoren im Vergleich zu HPV-negativen mit einer 2-Jahres-Überlebensrate von 55 % gegenüber 28 % eine bessere Prognose [84]. Dies ist vermutlich auf die erhöhte Therapiesensitivität HPV-assoziiierter Karzinome zurückzuführen [84].

Mutationen betreffen häufig die Signalwege PI3K–PTEN–AKT (10–20 %), NOTCH1 (10–19 %) sowie CASP8 (8–9 %), wobei letztere mit gestörter Apoptose assoziiert sind [85].

EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) ist in etwa 38–47 % der HNSCC-Tumoren überexprimiert, insbesondere in schlecht differenzierten und fortgeschrittenen Tumoren, was eine ungünstige Prognose bedingt [86].

Interessanterweise ist EGFR auch im umgebenden, histologisch unauffälligen Gewebe erhöht exprimiert, was die Theorie der „condemned mucosa“ unterstützt [18].

Aufgrund dessen führte die Einführung von Cetuximab zur Entwicklung des sogenannten EXTREME-Regimes (Cetuximab + Cisplatin + 5-FU), das eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens, des progressionsfreien Überlebens und der Ansprechrate im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie zeigte [63].

1.3.3 Molekulare Abgrenzung von Tumorrezidiven und sekundären Primärkarzinomen beim oralen Plattenepithelkarzinom

Trotz erheblicher Fortschritte in der Diagnostik und Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms stellen Rezidive oder Sekundäre Primärkarzinome weiterhin eine große Herausforderung dar. Die derzeit gültigen klinischen Kriterien zur Unterscheidung dieser Entitäten, etwa nach Warren und Gates [87] oder den Modifikationen nach Hong et al. [88], basieren auf Lokalisation, zeitlichem Abstand und histologischer Differenzierung. Diese Klassifikationen sind jedoch in vielen Fällen unzureichend, da sie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen nicht erfassen [89; 90]. Molekularbiologische Studien haben gezeigt, dass Rückfälle klinisch als Rezidive eingestuft wurden, obwohl sie genetisch keine klonale Beziehung zum Primärtumor aufwiesen – und somit vermutlich sekundäre Primärkarzinomen waren [91; 92; 93; 94]. Diese Diskrepanz zeigt, dass klinische Kriterien alleine nicht verlässlich sind. Techniken wie LOH-Analysen, TP53-Mutationen oder X-Chromosomen-Inaktivierung erlauben gewisse Rückschlüsse, reichen jedoch nicht aus, um Tumorrezidiv, sekundär auftretenden Primärtumor oder sogenannte Second Field Tumors (SFT) eindeutig zu unterscheiden. Letztere entstehen aus demselben prämaligen Feld wie der

Primärtumor, unterscheiden sich aber im späteren Verlauf genetisch vom Ursprungstumor [89].

Ein zentrales Konzept zur molekularen Differenzierung zwischen Tumoren ist die sogenannte „Klonalität“, also die Frage, ob zwei Neoplasien vom gleichen Vorläuferzellklon abstammen. Der Nachweis gemeinsamer früher genetischer Veränderungen – etwa durch TP53-Mutationen oder Verluste von Allelen in Mikrosatellitenregionen – gilt als Hinweis auf einen klonalen Ursprung. Allerdings stellt die Interpretation dieser Daten eine Herausforderung dar: Eine identische Mutation spricht zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine klonale Beziehung, das Fehlen eines solchen Musters schließt diese jedoch nicht sicher aus. Entscheidend ist die Anwendung eines breiten Panels molekularer Marker, da Einzelanalysen (z. B. nur TP53) zu Fehleinschätzungen führen können. Es wird zudem immer deutlicher, dass Klonalität keine binäre Kategorie ist, sondern ein Kontinuum genetischer Verwandtschaft darstellt, das durch Tumorerheterogenität und klonale Evolution beeinflusst wird [95].

Das Konzept der "Field Cancerization", ursprünglich von Slaughter et al. eingeführt [83], beschreibt die gleichzeitige karzinogene Veränderung mehrerer Areale der Schleimhaut durch kanzerogene Exposition (z. B. Tabak), wobei genetische Veränderungen selbst in histologisch unauffälligem Gewebe auftreten können [96; 97]. Dies erklärt, warum Rezidive auch bei negativen Resektionsrändern entstehen können [98; 99].

Ein genetisch basierter Klassifikationsvorschlag von Braakhuis et al. [89; 90] unterscheidet:

- **Tumorrezidiv** – genetische Übereinstimmung mit dem Primärtumor,
- **Sekundärer Primärtumor** – keine genetische Überlappung; eigenständiger Ursprung,
- **Second Field Tumors** – gemeinsame frühe Mutationen, aber divergierende spätere Mutationen.

Moderne Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologien haben eine Vielzahl spezifischer Mutationen im oralen Plattenepithelkarzinom identifiziert, darunter TP53, PIK3CA, CDKN2A und NOTCH1 [85; 100; 101; 102; 103]. Studien wie jene von Stransky et al. [85] und Lawrence et al. [100; 101] zeigen, dass das orale Plattenepithelkarzinom insbesondere bei

Tabakkonsumenten genetische Überschneidungen mit anderen Tumorarten – etwa dem Lungenkarzinom – aufweist.

Die Unterscheidung von Tumorrezidiv und sekundärem Primärkarzinom hat prognostische Relevanz. So zeigten González-García et al. [104], dass die krankheitsspezifische Überlebensrate beim sekundär primären Karzinom signifikant höher war als bei Tumorrezidiv. Demgegenüber stellten Rennemo et al. [105] keine signifikanten Unterschiede im krankheitsspezifische Überlebensrate fest. Dies weist wiederum auf die Unsicherheit der bisherigen Klassifikationen hin.

Neben genetischen Markern gibt es auch epigenetische Veränderungen in histologisch gesunden Resektionsrändern, die auf ein erhöhtes Risiko für die Bildung eines sekundären Primärkarzinoms hinweisen. Die Überexpression bestimmter Gene (z. B. MMP9, EPCAM, PTHLH, MMP1, COL4A1) wurde mit der Entwicklung sekundärer Primärkarzinome in Verbindung gebracht [99; 106]. Nicht-invasive Verfahren wie die Autofluoreszenz-Technologie nach Poh et al. [107] könnten in Zukunft helfen, molekular veränderte Felder in vivo zu erkennen.

Ein signifikanter prognostischer Marker für das Auftreten eines Rezidivs war laut Blatt et al. das histopathologische Grading. Patienten mit mäßig (G2) oder schlecht (G3) differenzierten Tumoren wiesen eine signifikant höhere Rezidivrate auf als jene mit gut differenzierten Karzinomen (G1) ($p < 0,001$). Zusätzlich zeigte sich ein positiver Lymphknotenstatus (N+) als weiterer Risikofaktor für ein Tumorrezidiv ($p = 0,004$). Wiederum hatten Tumorgröße, Geschlecht, Risikofaktoren wie Tabak- und Alkoholkonsum sowie der Resektionsstatus keinen signifikanten Einfluss auf die Rezidiventwicklung [108]. In derselben Studie ergaben die Kaplan-Meier-Analysen, dass neben Tumorgröße und Lymphknotenstatus auch das Grading sowie das Auftreten eines Rezidivs signifikant mit der Gesamtüberlebenszeit assoziiert waren (jeweils $p < 0,001$). Besonders schlecht differenzierte Tumoren und frühe Rezidive gingen mit einer deutlich schlechteren Prognose einher [108].

Insgesamt zeigt die Literatur, dass eine molekulare Charakterisierung von oralen Plattenepithelkarzinomrezidiven weit über die Möglichkeiten klinischer Klassifikation

hinausgeht. Die Etablierung genetischer Profile könnte helfen, die Rückfallarten besser zu differenzieren, das Management individuell anzupassen und letztlich die Prognose der Patienten zu verbessern [89; 90; 109]. In diesem Zusammenhang gewinnt das Konzept der Krebsstammzellen zunehmend an Bedeutung, da diese Zellen als mögliche Treiber von Therapieresistenz und Rezidivbildung gelten.

1.4 Krebsstammzellen im oralen Plattenepithelkarzinom

Ein wesentliches Merkmal normaler pluripotenter Stammzellen ist ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm [110]. Diese Eigenschaften werden durch ein Netzwerk sogenannter Master-Transkriptionsfaktoren wie OCT4, SOX2 und NANOG reguliert, welche für den Erhalt des pluripotenten Zustands entscheidend sind [111]. Während diese Transkriptionsfaktoren ursprünglich bei embryonalen Stammzellen beschrieben wurden, konnten sie inzwischen auch in bestimmten Zellpopulationen adulter Gewebe wie Brust und Gehirn nachgewiesen werden [112].

In normalen embryonalen Stammzellen (ESCs) wirkt OCT4 als zentraler Regulator der Mesoderm-Differenzierung, während es gleichzeitig die Differenzierung in das ektodermale Lineage hemmt [113; 114]. SOX2 hingegen fördert die ektodermale Differenzierung und unterdrückt mesodermale Entwicklungswege [113]. Daneben wirkt NANOG unterstützend und moduliert das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung, wobei es in differenzierten Zellen sukzessive herunterreguliert wird [113; 115]. Diese Gene regulieren sich zudem autoregulatorisch, was ihre Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Stammzellidentität unterstreicht [111].

Die kontrollierte Expression dieser Transkriptionsfaktoren ist essenziell, um die Balance zwischen Stammzellerhalt und geordneter Zelldifferenzierung zu sichern [111]. Eine schematische Darstellung dieser Prozesse findet sich in der nachfolgenden Abbildung (Abbildung 1), die den Zyklus der Selbsterneuerung sowie die Differenzierung multipotenter Stammzellen in die drei Keimblätter veranschaulicht. In diesem Modell ist auch die

physiologisch regulierte Aktivität von OCT4, SOX2 und NANOG dargestellt, wie sie in normalen Stammzellen vorkommt [111].

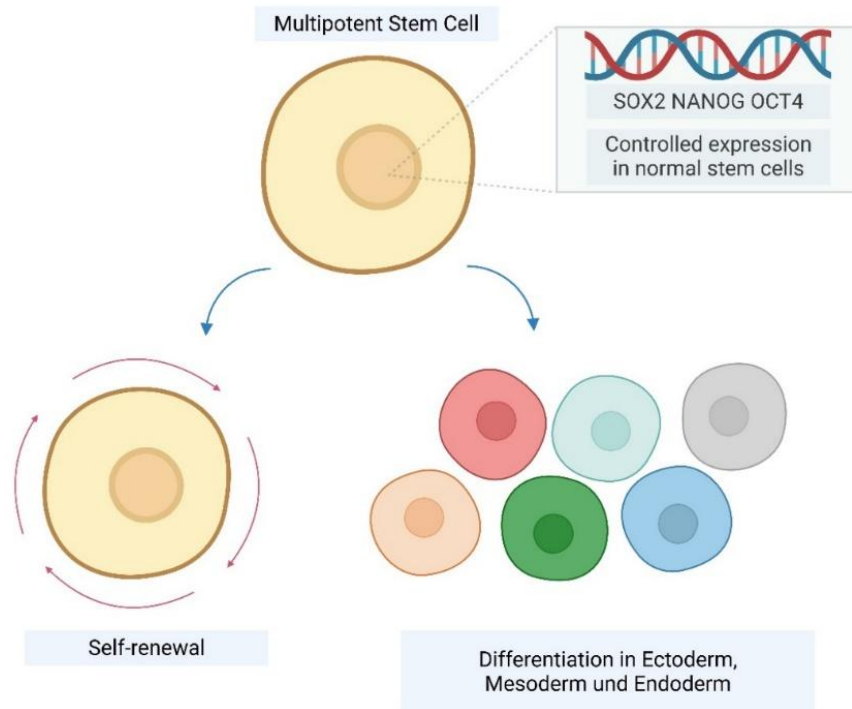


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktion pluripotenter Stammzellen. Multipotente Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (linke Seite) oder zur Differenzierung in Zellen des Ektoderms, Mesoderms und Endoderms (rechte Seite). Die Expression der Pluripotenz-Gene SOX2, OCT4 und NANOG wird in normalen Stammzellen streng kontrolliert, um eine geordnete Entwicklung zu gewährleisten [111; 116]. Modifiziert nach Seymour et al. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt [116].

Krebsstammzellen spielen eine zentrale Rolle. Sie zeichnen sich durch Selbst-Erneuerung, Tumorentstehung und Migrationsfähigkeit aus [117; 118; 119; 120; 121; 122; 123; 124; 125]. Ihre Herkunft wird unterschiedlich erklärt: Entweder entstehen sie durch Mutation normaler Stammzellen, durch dedifferenzierte Tumorzellen oder durch Umprogrammierung epithelialer Zellen [126; 127; 128; 129]. Krebsstammzellen besitzen die Fähigkeit, intraepithelial zu

migrieren, was sie zu den Hauptakteuren des monoklonalen Feldkanzerisierungsprozesses macht [130; 131; 132].

Die Existenz von Krebsstammzellen in der tumornahen Mukosa konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden: Marker wie OCT4, SOX2, ALDH1A1, CD44, ABCG2 und andere wurden in prämaligen Feldern identifiziert – sowohl in klinisch unauffälligem Gewebe als auch in präkanzerösen Läsionen [133; 134; 135]. Diese Marker deuten nicht nur auf eine mögliche dedifferenzierte Herkunft der Krebsstammzellen hin, sondern auch auf deren Rolle bei Rezidiv- und Entstehung von Zweitkarzinomen [136; 137]. Zahlreiche molekulare Marker, die typischerweise mit Feldkanzerisierung assoziiert sind – wie LOH, TP53, Telomeraseaktivität, MMP9, S100A4, SNAIL, VEGF-A – zeigen auch enge Verbindungen zu Krebsstammzellen [89; 138; 139]. Beispielsweise führt der Verlust von p53 zur verstärkten Expression von CD44 in Krebsstammzellen, während eine Mutation im RB-Gen zur Proliferation von Krebsstammzellen-ähnlichen Zellen führt [138; 140; 141; 142].

Ein Modell zur Krebsstammzell-gesteuerten Feldkanzerisierung sieht vor, dass Karzinogene initiale Mutationen in TP53, p16 oder FHIT in den epithelialen Stammzellen auslösen. Diese transformieren sich in Transient Amplifying Cells (TACs), welche sich ausbreiten und ein prämaliges Feld bilden. Spätere Mutationen – insbesondere im RB-Gen – setzen die Krebsstammzellen aus dem Ruhestadium frei und führen zur Tumorentstehung [138].

Im polyklonalen Szenario entstehen Krebsstammzellen an verschiedenen Stellen unabhängig voneinander, was zu genetisch unterschiedlichen Subklonen führt. Im monoklonalen Modell dagegen breiten sich Krebsstammzellen von einem Ursprungsort aus, was die Entstehung genetisch verwandter Tumoren an verschiedenen Stellen bedingt [131; 143; 144].

Klinisch relevant ist, dass SPTs und Rezidive häufig schwer zu unterscheiden sind, da sie sich im gleichen Feld entwickeln können. Krebsstammzellen könnten hier als Marker für die Klonalität dienen, um zwischen echtem Rezidiv (gleiche Klonalität) und SPT (unterschiedlich) zu unterscheiden [143; 144]. Entsprechend könnten Krebsstammzell-Marker künftig nicht nur zur Diagnostik, sondern auch zur Risikostratifizierung und Therapie eingesetzt werden [138; 145; 146; 147; 148; 149].

Die abweichende Expression von SOX2, NANOG und OCT4 in Krebsstammzellen trägt zur Progression des oralen Krebses bei, indem sie die Selbsterneuerung, Tumorentstehung und -wachstum, die Metastasierung (durch Verminderung von E-Cadherin) sowie die Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie fördert, wie in Abbildung 2 [93; 94; 150; 151; 152; 153; 154; 155; 156; 157; 158; 159].

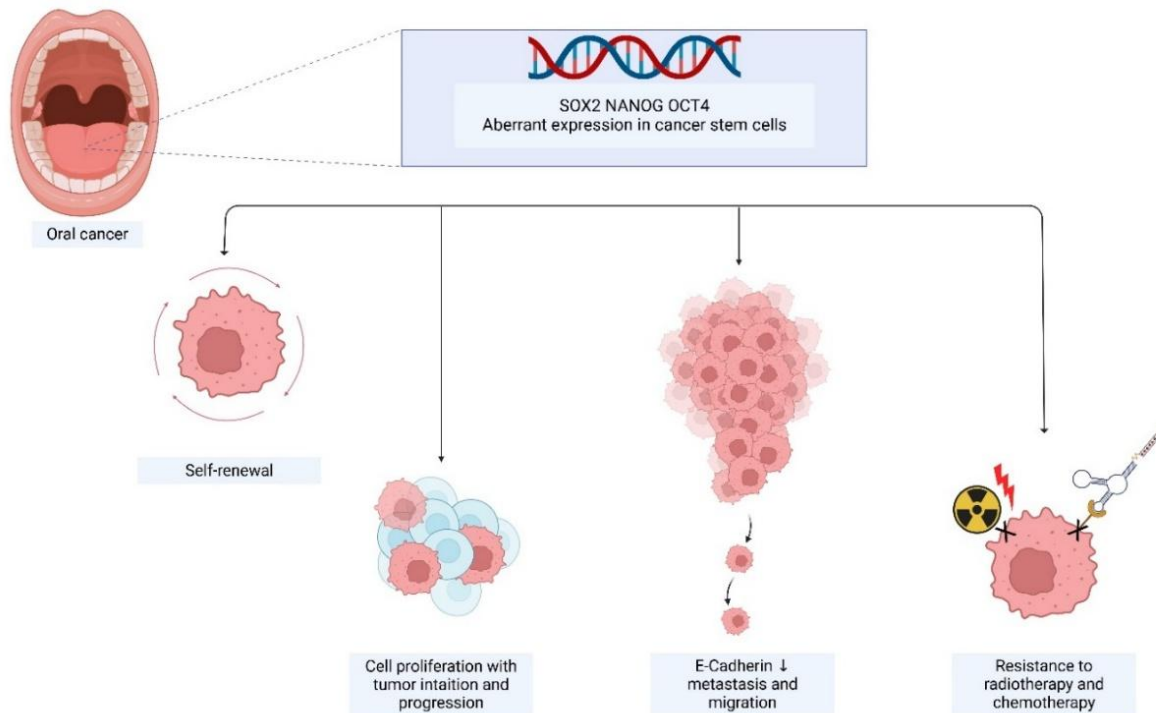


Abbildung 2: Überexpression von SOX2, NANOG und OCT4 in Krebsstammzellen fördert oralen Krebs durch Steigerung der Selbsterneuerung, des Tumorwachstums, der Metastasierung (\downarrow E-Cadherin) sowie der Resistenz gegen Radio- und Chemotherapie. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

1.4.1 Rolle von SOX2 im oralen Plattenepithelkarzinom

Sex-determining region Y-box 2 (SOX2) ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen sowie an verschiedenen

Entwicklungsprozessen beteiligt ist [160; 161]. SOX2 befindet sich auf dem Chromosom 3q26.3–q27 und wurde als wichtiges Onkogen beim oralen Plattenepithelkarzinom identifiziert. Seine Überexpression wird mit erhöhter Tumorzellproliferation, Metastasierung, Therapieresistenz und der Förderung der EMT in Verbindung gebracht [151; 152; 157; 158].

Beim oralen Plattenepithelkarzinomen kommt SOX2 als amplifiziertes Gen vor und spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Stammzellähnlichkeit der Tumorzellen [162; 163]. Die SOX2-Amplifikation könnte beim oralen Plattenepithelkarzinom für eine frühzeitige Diagnose und eine präzisere Prognosebewertung von Bedeutung sein [162; 164]. He et al. fanden zudem eine signifikante Korrelation zwischen der SOX2-Amplifikation und dem pathologischen Grading der Tumoren [164; 165]. Weiterhin wurde ein deutlicher Unterschied in der SOX2-Expression zwischen oralen Plattenepithelkarzinomen, oraler epithelialer Dysplasie und normaler oraler Schleimhaut festgestellt [165]. Frühere Arbeiten belegten eine Überexpression von SOX2 in Proben oraler Plattenepithelkarzinome [163]. In vitro zeigte sich, dass die Behandlung der oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien CAL27 und UMSCC74A mit kationischen Lipid-Nanopartikeln zur Übertragung von pre-miR-107 die SOX2-Expression deutlich senkte. Dies ging mit einer verringerten Anzahl und Größe der gebildeten Tumorsphären einher [163]. Der zugrundeliegende Mechanismus, über den miR-107 die SOX2-Expression bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs reguliert, bleibt jedoch bislang ungeklärt [163]. Schließlich wurde gezeigt, dass eine Überexpression von SOX2 zur Deregelierung von Genen führt, die an malignen Prozessen, Zellmigration und wachstumsunabhängigem Überleben beteiligt sind [164; 166].

1.4.2 Rolle von NANOG im oralen Plattenepithelkarzinom

NANOG spielt eine zentrale Rolle bei der Selbsterneuerung von Krebsstammzellen, indem es die Zellproliferation über die Regulation von Cyclin D beeinflusst, die E-Cadherin-Expression zur Förderung der Zellmigration verringert und p53 hemmt, um Apoptose zu verhindern [167]. NANOG ist ein Transkriptionsfaktor mit Homöodomäne, der an der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung undifferenzierter embryonaler Stammzellen beteiligt ist [111; 168].

Im menschlichen Genom sind bislang elf NANOG-Pseudogene beschrieben, von denen nur das NANOG-Homeobox-Pseudogen 8 (Nanogp8) ein vollständiges offenes Leseraster besitzt und somit ein funktionelles NANOG-Protein codieren kann [168; 169]. Bei oralen Plattenepithelkarzinomen wurde eine verstärkte NANOG-Expression vor allem in wenig differenzierten und undifferenzierten Tumorzellen festgestellt, was auf eine zentrale Rolle bei der Tumorinvasion und Metastasierung hinweist [168; 170]. Eine Überexpression von NANOG wurde zudem mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer Resistenz gegenüber Cisplatin assoziiert [168; 171].

Mehrere Studien haben den Zusammenhang zwischen der NANOG-Expression und klinischen Parametern oraler Plattenepithelkarzinome untersucht. Während Hwang et al. keinen Zusammenhang zwischen der NANOG-Expression und dem klinischen Tumorstadium feststellen konnten [168; 172], berichten andere Arbeiten über eine Korrelation einer erhöhten NANOG-Expression mit einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit, Lymphknotenmetastasen, dem Auftreten zirkulierender Tumorzellen, einer ausgeprägten lokoregionalen Aggressivität sowie einem erhöhten Risiko für Tumorrezidive [168; 173; 174].

Einige Autoren gehen davon aus, dass eine erhöhte NANOG-Expression im angrenzenden, nicht vom Tumor betroffenen Gewebe als ein früher Indikator für ein erhöhtes Risiko zur Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms dienen könnte [155; 168], während andere Studien keinen signifikanten Unterschied der NANOG-Expression nachweisen konnten [168; 175]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NANOG eine Vielzahl nachgeschalteter Zielgene reguliert, darunter Cyclin D1, c-Myc, Snail, Slug, E-Cadherin, OCT-4, die Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und -9 sowie Mitglieder der ATP-binding cassette superfamily G (ABCG)-2 [168]. Diese Gene sind häufig bei oralen Plattenepithelkarzinomen überexprimiert [168]. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass NANOG durch die Hochregulation dieser Zielgene zur Förderung der Zellteilung, Metastasierung und Arzneimittelresistenz oraler Plattenepithelkarzinome beiträgt.

1.4.3 Zusammenhang von SOX2/NANOG-Expression mit Therapieresistenz und Prognose

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass eine Überexpression von SOX2 und NANOG mit einer erhöhten Tumoraggressivität und ungünstigen klinischen Verläufen einhergeht [176; 177]. Die Rolle von SOX2 in der Entwicklung einer Radioresistenz ist komplex und in der aktuellen Literatur nicht einheitlich beschrieben. Während einige Studien darauf hinweisen, dass SOX2 die Wirkung ionisierender Strahlung verstärken und damit die Prognose bestrahlter Patienten verbessern kann, legen andere Forschungsergebnisse nahe, dass die Inhibition von SOX2 vielmehr zur Ausbildung eines strahlenresistenten Phänotyps führen könnte [178]. Für NANOG wurde in ALDH-positiven Brustkrebszellen eine strahlenresistenzfördernde Wirkung beschrieben, die vermutlich auf einer gesteigerten ALDH-Aktivität sowie einer verbesserten Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSBs) basiert. An diesem Prozess scheinen der NOTCH1- und der AKT-Signalweg beteiligt zu sein [179]. Obwohl die funktionelle Bedeutung von SOX2 und NANOG beim primären oralen Plattenepithelkarzinom bereits mehrfach untersucht wurde [151; 171; 180; 181; 182; 183; 184], ist deren prognostischer Stellenwert beim rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom bislang nur unzureichend erforscht.

1.5 Ziel der Studie

Ziel dieser Studie ist es, die Expressionsmuster von SOX2 und NANOG sowohl im primären als auch im rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom zu untersuchen – mit besonderem Fokus auf den Einfluss einer adjuvanten Therapie auf deren Expression. Darüber hinaus wird die prognostische Relevanz dieser Marker analysiert, basierend auf ihrer Präsenz im Rezidivtumor und ihrem Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben bzw. mit dem krankheitsfreien Überleben nach dem Rezidiv (post-recurrence Overall Survival, prOS bzw. post-recurrence Disease-Free Survival, prDFS). Die vorliegende Arbeit basiert auf einer Einzelzentrums-Kohortenstudie. Die klinischen Daten wurden prospektiv erhoben und kontinuierlich dokumentiert, während die immunhistochemischen Untersuchungen retrospektiv erfolgten. Ziel ist es, die Risikostratifizierung zu verbessern und potenzielle Grundlagen für individualisierte Therapieansätze bei Patienten mit rezidivierendem oralen Plattenepithelkarzinom zu schaffen.

2. Methoden

2.1 Patientenkohorte

Zwischen 1992 und 2019 wurden in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Lübeck insgesamt 1.088 Krebspatienten behandelt. Aus dieser Gruppe wurden 94 Patienten mit einem Rezidiv eines oralen Plattenepithelkarzinoms für diese Studie ausgewählt. Diese Patienten wurden mit kurativer Intention behandelt, entweder durch alleinige Operation oder durch eine Kombination aus Operation und (Chemo-)Radiotherapie. Patienten mit Oropharynxkarzinomen oder anderen histologischen Tumorentitäten, die nicht Plattenepithelkarzinome waren, wurden nicht berücksichtigt. Darüber hinaus wurden Patienten mit bereits metastasierter Erkrankung zum Diagnosezeitpunkt, solche, die eine Behandlung ablehnten oder vor Therapiebeginn verstarben, sowie Patienten ohne lokoregionales Rezidiv nicht in die Analyse einbezogen (Abbildung 3).

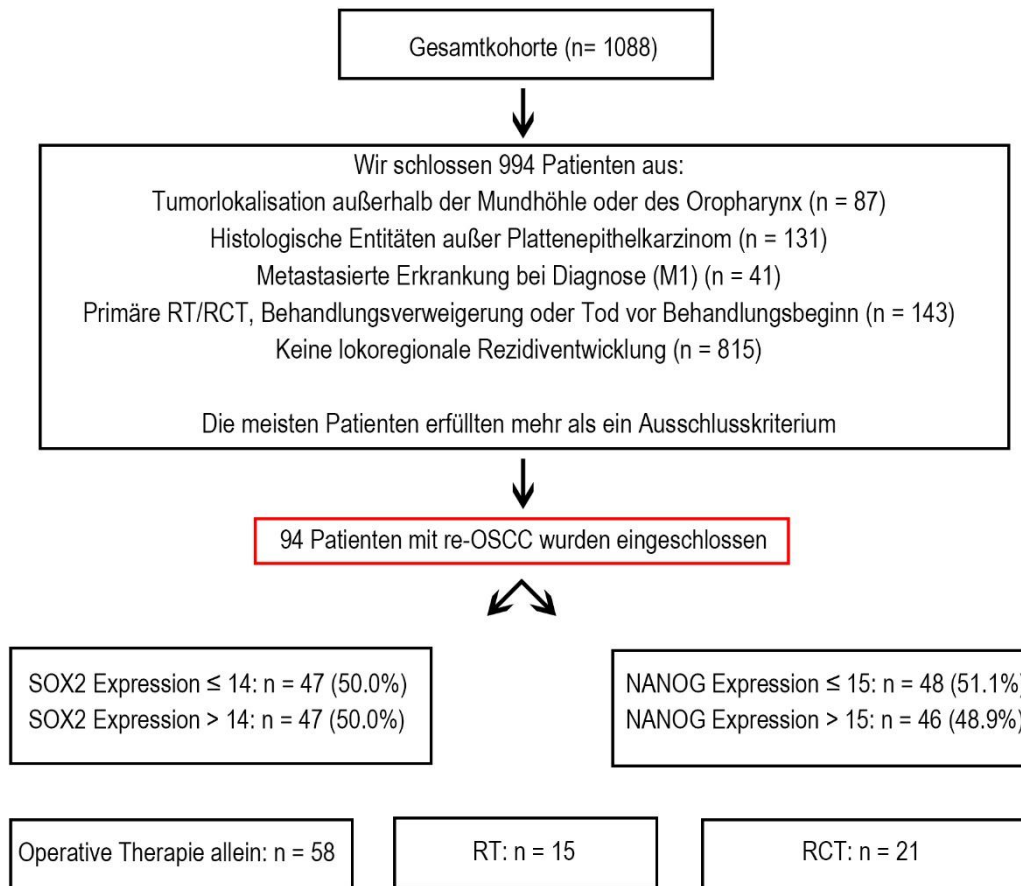


Abbildung 3: Darstellung der Patientenselektion und -stratifizierung. Patienten mit einem malignen Befund, die am Universitätsklinikum Lübeck behandelt wurden, wurden zunächst systematisch gescreent. Ein Großteil wurde aufgrund zuvor definierter Einschluss- und Ausschlusskriterien von der Analyse ausgeschlossen. Die finale Studienkohorte umfasste ausschließlich Fälle von rezidivierendem oralen Plattenepithelkarzinom, bei denen eine kurativ intendierte Therapie durchgeführt worden war. Diese Patientengruppe wurde anschließend anhand der Expressionsniveaus von SOX2 und NANOG weiter untergliedert und zusätzlich nach dem jeweils erhaltenen Therapiekonzept stratifiziert – darunter alleinige chirurgische Behandlung, Radiotherapie (RT) sowie kombinierte Radiochemotherapie (RCT).

Alle eingeschlossenen Patienten wurden einem streng strukturierten Nachsorgesystem unterzogen, um eine konsequente Überwachung über einen Zeitraum von fünf Jahren nach der Therapie sicherzustellen. In den ersten zwei Jahren erfolgten Nachsorgeuntersuchungen im Turnus von jeweils drei Monaten, danach halbjährlich.

Zu Studienbeginn und bei jeder Nachsorgeuntersuchung wurden demografische Daten, Risikofaktoren, klinische Tumorcharakteristika und Behandlungsentscheidungen prospektiv dokumentiert. Der allgemeine Gesundheitszustand der Patienten wurde mithilfe des Charlson-Komorbiditätsindex bewertet [185], während Tumorstadien und konkurrierende Risikofaktoren in der Kohortenanalyse berücksichtigt wurden [186].

Aus der ursprünglichen Kohorte wurden 994 Patienten ausgeschlossen, sodass schließlich 94 Patienten mit einem Rezidiv des oralen Plattenepithelkarzinoms in die Analyse einbezogen wurden. Diese Patienten erhielten verschiedene Behandlungsansätze gemäß den deutschen Leitlinien zur Behandlung des oralen Karzinoms [187], darunter Operationen, Radio- bzw. Radiochemotherapie oder eine Kombination aus beiden. Patienten mit anderen Tumortypen als Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle wurden ebenfalls ausgeschlossen. Darüber hinaus wurden Patienten mit initial metastasierter Erkrankung, solche, die eine Behandlung ablehnten oder vor Beginn der Therapie verstarben, sowie Patienten ohne lokoregionale Rezidive von der Analyse ausgeschlossen [188].

2.2 Tissue Microarray und Immunhistochemische Färbung

Vor der Analyse wurde jeder Gewebe-Punch visuell auf Gewebefalten, Färbungsartefakte, geringe Gewebequalität und unzureichenden Tumorgehalt überprüft. Falls solche Mängel festgestellt wurden, wurden die betreffenden Proben aus der Analyse ausgeschlossen (Abbildung 4).

Die Tissue Microarrays (TMAs) wurden mithilfe eines Tissue-Arrayers (manueller Tissue Arrayer MTA-1, AlphaMetrix Biotech) erstellt. Die Tumorregionen der formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebelöcke wurden mit einem Durchmesser von 1,2 mm ausgestanzt und in die Empfängerblöcke übertragen. Pro Gewebelock wurden drei Stanzproben in die TMAs integriert, um die intratumorale Heterogenität möglichst genau abzubilden. Die Empfängerblöcke wurden anschließend mit einem Mikrotom (Microm HM355S, ThermoScientific) in 4 µm dicke Schnitte unterteilt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und in einem Wasserbad bei 50 °C ausgebreitet. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation in einem Heißluftofen bei 60 °C.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit einem vollautomatischen Färbeapparat (Ventana BenchMark, Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt. Die verwendeten Antikörper-Färbemethoden basierten auf früheren Studien der Forschungsgruppe. Die Färbungen wurden gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt, wobei positive und negative Kontrollen eingesetzt und erforderlichenfalls modifiziert wurden, um optimale Färbegergebnisse zu erzielen [186].

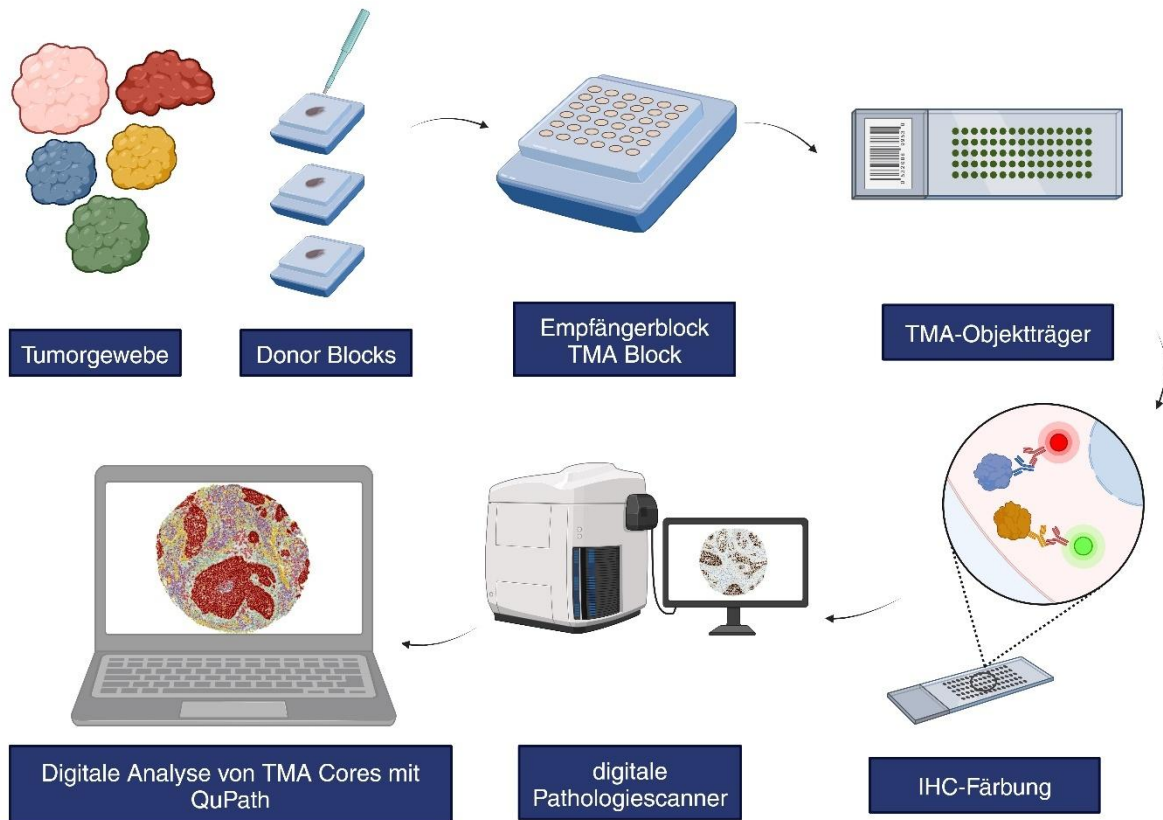


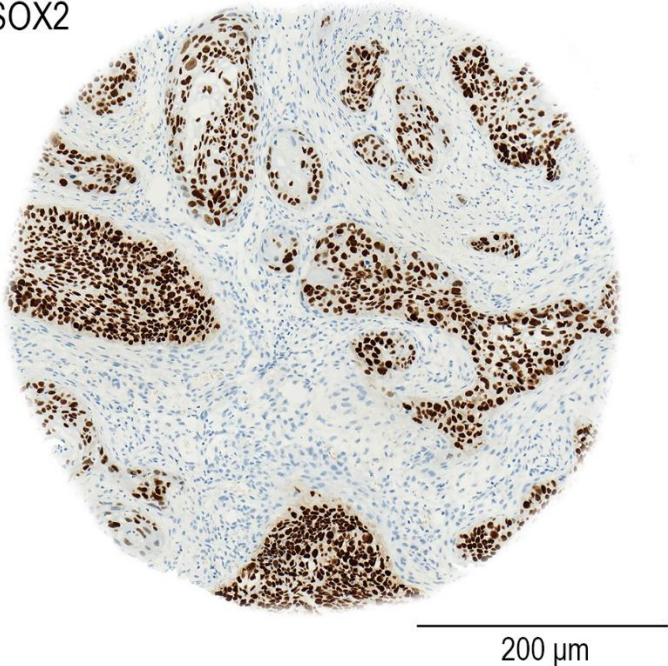
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Tissue-Microarray-(TMA)-basierten immunhistochemischen Analyse. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Der Ablauf umfasst die Auswahl von Tumorgewebe, das Stanzen aus Donor-Blöcken, die Übertragung in einen Empfängerblock, das Schneiden auf Objektträgern, die Durchführung der immunhistochemischen Färbung sowie die Digitalisierung der Schnitte mit einem Pathologiescanner. Die digitale Auswertung erfolgt anschließend mittels QuPath-Software zur quantitativen Analyse der Markerexpression auf zellulärer Ebene.

In unserer Untersuchung wird durch die immunhistochemische Analyse bestätigt, dass SOX2 eine nukleäre Färbung zeigt, wie bereits in vorherigen Studien erwähnt wurde [189]. Im Gegensatz dazu weist NANOG bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom ein zytoplasmatisches Färbungsmuster auf, was auch in unserer Gruppe festgestellt wurde (Abbildung 5). In zahlreichen Fällen des oralen Plattenepithelkarzinoms weist NANOG im

Gegensatz zur überwiegend nukleären Färbung, wie sie typischerweise bei Keimzelltumoren beschrieben wurde [190; 191], eine ausgeprägte zytoplasmatische Färbung auf.

A SOX2



B NANOG

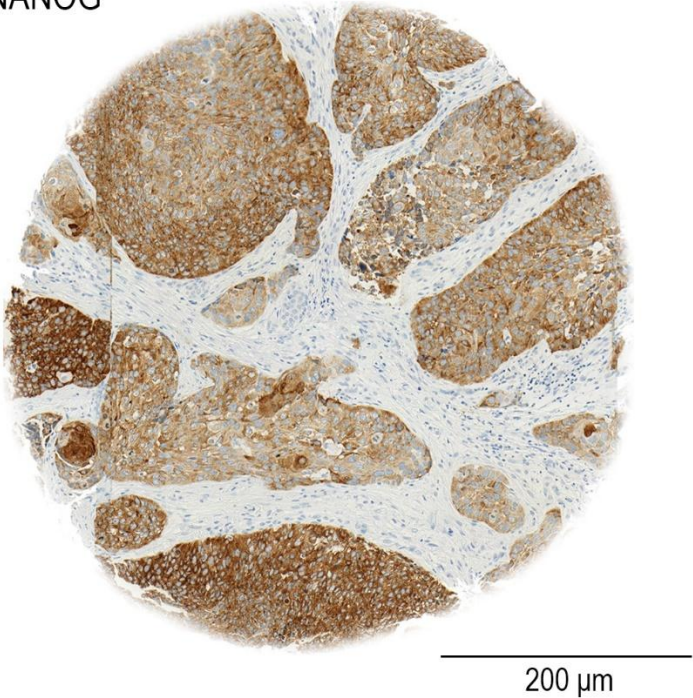


Abbildung 5: Repräsentative immunhistochemische Darstellung von TMA-Cores aus unserer Patientenkohorte mit oralem Plattenepithelkarzinom. Die SOX2-Expression zeigt eine vorwiegend nukleäre, die NANOG-Expression eine zytoplasmatische Lokalisation. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Die Antigen-Retrieval für die Färbung von SOX2 erfolgte durch hitzeinduzierte Rückgewinnung in einem Natriumcitrat-Puffer (pH 6,0) bei einer Temperatur von 92 °C über einen Zeitraum von 32 Minuten. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur mit einem Anti-SOX2-Antikörper (Verdünnung 1 µg/ml) behandelt und SOX2 wurde anschließend mithilfe eines biotinylierten Sekundärantikörpers und einer Streptavidin-Peroxidase-Lösung nachgewiesen. Die Färbung wurde unter Verwendung von Hämatoxylin durchgeführt.

Die Antigen-Retrieval für die Färbung von NANOG wurde ebenfalls bei 92 °C für 32 Minuten mit einem Natriumcitrat-Puffer (pH 6,0) durchgeführt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur mit einem Anti-NANOG-Antikörper in einem Verhältnis von 1:1000 bis 1:2500 inkubiert. Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurde ein Sekundärantikörper, der mit Biotin markiert war, für 30 Minuten appliziert, gefolgt von einer Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase. Die Färbung wurde unter Verwendung von 3',3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) durchgeführt und anschließend mit Hämatoxylin kontragefärbt.

Zur Bestätigung von SOX2 wurden menschliches Glioblastomgewebe und Proben der NCCIT-Zelllinie (humane pluripotente embryonale Karzinomzellen) verwendet. Zur Bestätigung der NANOG-Färbung wurden NCCIT-Zellen und embryonales Karzinomgewebe als positive Kontrollen eingesetzt.

Um die Spezifität der Färbung zu überprüfen, wurden negative Kontrollen durchgeführt, indem die Primärantikörper während des Färbeprozesses weggelassen wurden.

Für die Digitalisierung der Schnitte wurde ein Ventana iScan HT Scanner (Ventana, Tucson, USA) verwendet. Die computergestützte Bildanalyse wurde mit der Open-Source-Software QuPath (Version 0.2.3) durchgeführt [192].

Die Bilder wurden mit QuPath als .tif-Dateien untersucht. Die Datenerfassung und Analyse erfolgte auf einem Windows-10-System mit einem 12,3-Zoll-Display (2736 × 1824 Pixel).

Für die Auswertung der Gewebeproben wurden die TMA-Cores mithilfe der integrierten TMA Dearrayer-Funktion der Software QuPath ausgewählt. Die zugehörigen Patientendaten wurden zuvor in vorbereiteten Excel-Tabellen erfasst und in das System importiert, um eine korrekte Zuordnung der einzelnen Gewebekerne zu den entsprechenden Patienten sicherzustellen. Die relevanten Bereiche – einschließlich Tumorzellen, Immunzellen sowie stromalen Anteilen – wurden manuell als Regionen von Interesse (Regions of Interest, ROI) markiert.

Zur Identifikation positiver Zellen wurde das Werkzeug zur Zellklassifikation auf Basis der Optical-Density-Sum-Methode (OD-Sum) eingesetzt, um Artefakte wie Zellkernfragmentierung zu minimieren. Die Analyseparameter wie Pixelgröße, Hintergrundradius, Medianfilter-Radius, Zellkerngröße und Zellbereichsausdehnung wurden gezielt angepasst. So konnte eine präzise Zellidentifikation erreicht werden.

Anschließend wurden geglättete Heatmaps erstellt, die klassifikationsrelevante zelluläre Merkmale visuell darstellen. Auf Basis der manuell annotierten Regionen wurde ein Random-Forest-Klassifikator trainiert, um eine automatisierte und verlässliche Klassifikation von Tumorzellen zu ermöglichen. Die gewonnenen Messwerte wurden mithilfe des TMA Data Viewers exportiert, wodurch eine anschließende Berechnung und Validierung des H-Scores erfolgen konnte.

Die Bildverarbeitung sowie die Quantifizierung des H-Scores wurden vollständig in QuPath durchgeführt – einer Plattform, deren Verlässlichkeit bereits in zahlreichen Arbeiten zur Tumorbioogie dokumentiert wurde [157; 186; 193]. Die Verlässlichkeit von QuPath für die H-Score-Bewertung konnte durch frühere Studien in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Um potenzielle Verzerrungen durch subjektive Beurteilungen zu vermeiden, wurde der gesamte Auswertungsprozess von zwei voneinander unabhängigen Fachpathologen begleitet.

Die schematischen Abbildungen in dieser Studie wurden mit der Software BioRender (<https://biorender.com>) erstellt.

2.3 Statistische Analyse

Deskriptive Statistiken wurden anhand von Häufigkeit, Prozentangaben, Medianwerten und Interquartilsbereichen (IQR) zusammengefasst. Kontinuierliche Daten wurden als Mittelwert (Standardabweichung, SD) sowie als Medianwerte mit IQR dargestellt.

Für die Überlebensanalysen wurde die Kaplan-Meier-Methode zur Schätzung der Wahrscheinlichkeiten für das postrezidivierende krankheitsfreie Überleben (prDFS) sowie das postrezidivierende Gesamtüberleben (prOS) verwendet. prDFS wurde als Zeitraum vom ersten Rezidiv bis zum Auftreten eines zweiten Rezidivs, des Todes oder des letzten Follow-up-Termins definiert. In diesem Zeitraum überlebte der Patient ohne Anzeichen oder Symptome der Krankheit. prOS wurde als Zeitraum vom ersten Rezidiv bis zum Todeszeitpunkt durch jegliche Ursache oder bis zum letzten Follow-up-Termin definiert.

Die univariate Analyse wurde mittels Log-Rank-Test für Gruppenvergleiche durchgeführt. Die Schoenfeld-Residuen wurden geplottet, um die Proportionalitätsannahme zu bewerten.

Für die Ermittlung des optimalen Cutoff-Werts wurden Histogramme, Kaplan-Meier-Plots sowie Hazard Ratios, Konfidenzintervalle und p-Werte generiert. Die Cutoff-Berechnung wurde mit dem „rolr“-Paket durchgeführt, das eine optimale Trennung in zwei Gruppen anhand von Überlebensdaten ermöglicht („rhier“-Funktion). Wo angemessen, wurden Median-Cutoff-Werte verwendet.

Die Kaplan-Meier-Diagramme wurden mit einer Kombination aus den Paketen „survival“, „survminer“, „ggplot2“ und „plotly“ erstellt. Hazard Ratios, Konfidenzintervalle und p-Werte wurden mit der „coxph“-Funktion aus dem „survival“-Paket berechnet.

Alle Tests wurden zweiseitig mit einer Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ durchgeführt, während die Schätzungen mit 95 %-Konfidenzintervallen (CI) angegeben wurden. Die Analysen wurden mit R Core Team (2023) ausgeführt: R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich. <https://www.R-project.org/>.

Soweit bekannt, ist dies eine der ersten Studien, die Überlebensraten bei rezidivierendem oralen Plattenepithelkarzinom basierend auf der Expression der Krebsstammzellmarker SOX2 und NANOG mithilfe einer semi-automatisierten Analyse immunhistochemischer Marker mittels QuPath-Software untersucht. Die angewandte Methode umfasst die Berechnung des postrezidivierenden Überlebens für Hochrisikogruppen sowie die Korrelation der standardisierten, auf dem H-Score basierenden immunhistochemischen Expression beider Marker mit klinischen Verlaufsdaten.

Die H-Score-Bewertung der Immunfärbung vergibt einen maximalen Wert von 300, indem die Prozentsätze der stark (Gewichtung: 3), moderat (Gewichtung: 2) und schwach (Gewichtung: 1) gefärbten Zellen summiert werden, was eine Skala von 0 bis 300 ergibt [14]. Ziel war es, diese Methode zu standardisieren, da bislang kein allgemeingültiger Goldstandard für die immunhistochemische Bewertung existiert (Abbildung 6).

Zusätzlich wurde ein direkter Vergleich der Antikörperexpression zwischen Primärtumoren und Rezidiven in Prozent durchgeführt. Die Auswertung erfolgte stratifiziert nach den jeweiligen Therapieansätzen (alleinige Operation, adjuvante Radiotherapie oder Radiochemotherapie) unter Verwendung des nichtparametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests, da die Daten keine Normalverteilung aufwiesen.

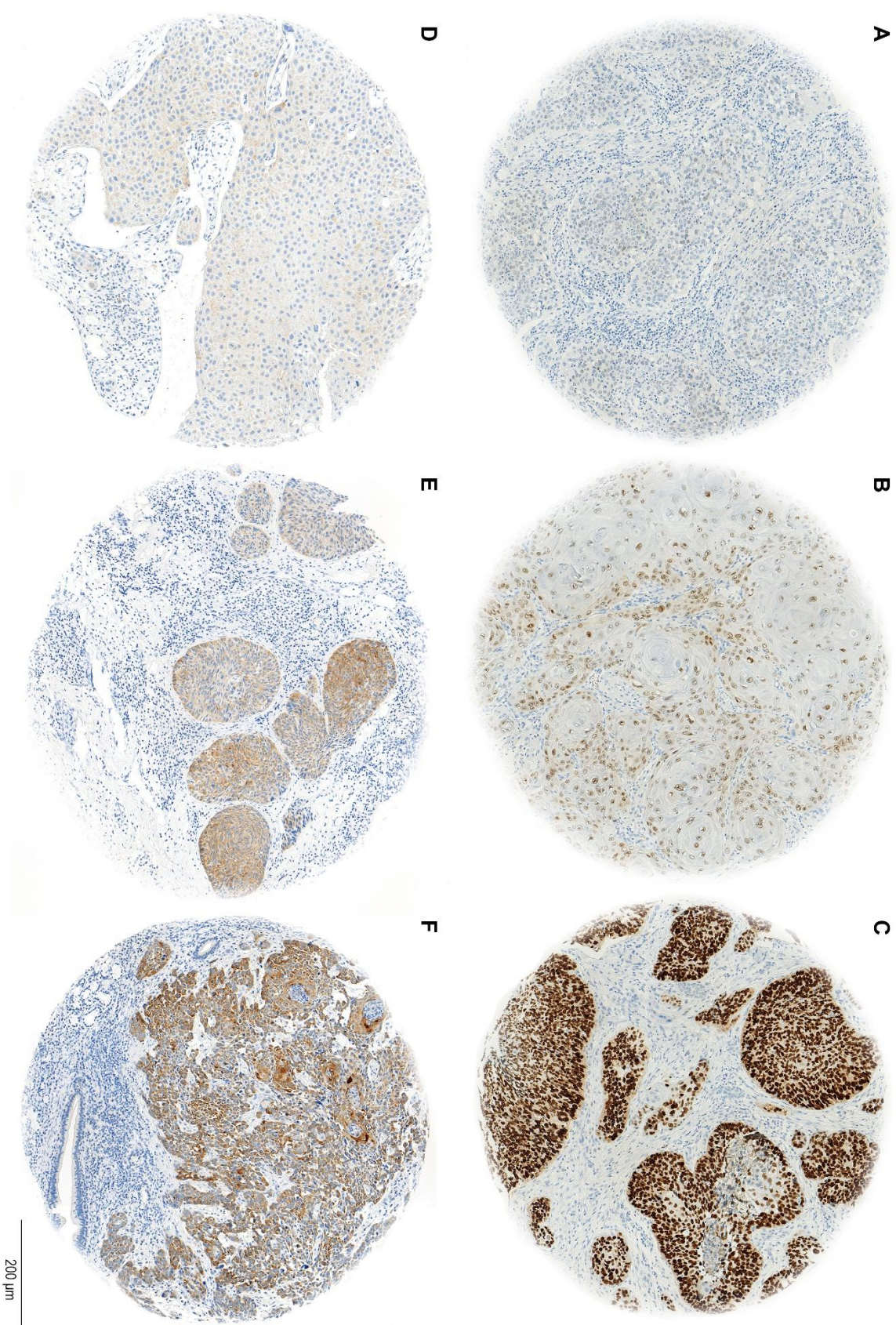


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt repräsentative TMA-Cores, gefärbt für SOX2 (A–C) und NANOG (D–F), mit schwacher (A, D), moderater (B, E) und starker (C, F) immunhistochemische Färbung. Der Maßstabsbalken stellt 200 µm dar.

2.4 Ethik

Alle Teilnehmer unterschrieben bei der Aufnahme Einverständniserklärungen, die die Erhebung und anonyme Verwendung ihrer Daten für wissenschaftliche Forschungszwecke autorisierten. Die Ethikkommission der Universität Lübeck genehmigte die Studie (ID: 16-272A).

3. Ergebnisse

Die vorliegende Untersuchung umfasst insgesamt 94 Patienten, die an einem rezidivierenden Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle litten. Ziel war es, prognostische Faktoren und den Einfluss verschiedener Marker (SOX2 und NANOG) auf das Überleben nach Wiederauftreten der Erkrankung zu analysieren.

3.1 Demografische und klinische Basisdaten

In Tabelle 1 sind die Ausgangsdaten der Studienpopulation aufgeführt. Das mediane Alter bei Studieneinschluss lag bei 62 Jahren (IQR: 52–71), während das mediane Alter zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose bei 63 Jahren (IQR: 53–72) lag. Die Mehrheit (68 %) der Teilnehmenden war männlich, wohingegen 32 % weiblich waren. Beim Charlson-Komorbiditätsindex (CCI) fand sich in 63 % der Fälle ein Wert von 0, während 37 % einen Wert ≥ 1 aufwiesen. Bezüglich des Rauchverhaltens gaben 78 % an, ehemalige oder aktive Raucherinnen und Raucher zu sein, während 22 % nie geraucht hatten. Ein übermäßiger Alkoholkonsum wurde von 60 % berichtet. Die häufigste Rezidivlokalisierung war der Mundboden (41 %), gefolgt von Wange/Vestibulum/Retromolarbereich und der Zunge (anteriore Anteile). Hinsichtlich des Tumorstadiums (rT) zeigte sich eine breite Verteilung mit rT1 (26 %), rT2 (18 %), rT3 (11 %), rT4 (31 %) und rTx (14 %). Der Lymphknotenstatus war bei 32 % rN0, bei 68 % rN+ oder rNx, während bei 8,8 % ein rM1 (Fernmetastasen) vorlag.

Die Resektabilität der Tumoren wird in der Tabelle ebenfalls ausgewiesen: 19 Patienten (68 %) hatten R0-Resektionsränder, wohingegen 9 (32 %) mit R1-, R2- oder nicht näher bestimmbar Rändern (R1/2/x) operiert wurden. Bei 66 Personen lagen keine entsprechenden Angaben vor. Die histopathologische Differenzierung (Grading) wurde in 6 Fällen (8,8 %) als „hoch differenziert“, in 40 Fällen (59 %) als „mäßig differenziert“ und in 22 Fällen (32 %) als „gering differenziert“ eingestuft; in 26 Fällen fehlten entsprechende Informationen.

Tabelle 1: Grundlegende demografische Daten aller Patienten und ihrer Tumoreigenschaften

Eigenschaften / Merkmale	N = 94
Alter (Median)	62 (52, 71)
Alter bei Rezidiv (Median)	63 (53, 72)
Geschlecht	
Weiblich	30 (32 %)
Männlich	64 (68 %)
CCI score	
0	59 (63 %)
1 ≤	34 (37 %)
Fehlend	1
Raucherstatus	
Nie geraucht	20 (22 %)
Ehemaliger oder aktueller Raucher	69 (78 %)
Fehlend	5
Alkoholkonsum	
Kein oder moderater Konsum	35 (40 %)
Hoher Konsum	52 (60 %)
Fehlend	7
Rezidivlokalisierung	
Zunge anterior	11 (12 %)
Wange/vestibulum/retromolar	13 (14 %)
Mundboden	39 (41 %)
Lippe	2 (2,1 %)
Nur Hals	15 (16 %)
Oropharynx	11 (12 %)
Gaumen	3 (3,2 %)
rT	
rT1	24 (26 %)
rT2	16 (18 %)
rT3	10 (11 %)
rT4	28 (31 %)
rTx	13 (14 %)
Fehlend	3
rN	
rN0	29 (32 %)
rN+/x	63 (68 %)
Fehlend	2
rM	
rM0/x	83 (91 %)

rM1	8 (8,8 %)
Fehlend	3
Resektionsrandstatus	
R0	19 (68 %)
R1/2/x	9 (32 %)
Fehlend	66
Grad	
Hoch differenziert	6 (8,8 %)
Mäßig differenziert	40 (59 %)
gering differenziert	22 (32 %)
Fehlend	26
<i>N= Patientenzahl</i>	

3.2 Überlebensergebnisse in Abhängigkeit von der SOX2-Expression

Tabelle 2 zeigt die Überlebensdaten der gesamten Patientenkohorte (n = 94), aufgeschlüsselt nach der SOX2-Expression anhand eines H-Score-Schwellenwertes von ≤ 14 bzw. > 14 . Beide Gruppen umfassen jeweils 47 Patienten. Die Gesamtmortalität („Tod aus jeglicher Ursache“) in der Kohorte betrug 71 %. In der Gruppe mit niedriger SOX2-Expression (H-Score ≤ 14) lag die Sterblichkeitsrate bei 83 % (39/47), in der Gruppe mit hoher Expression (H-Score > 14) bei 60 % (28/47). Bezogen auf die Todesursache („Todesursache“) verstarben in der niedrig exprimierenden Gruppe 70 % an einem oralen Plattenepithelkarzinom, weitere 13 % an anderen Ursachen. In der Gruppe mit hoher SOX2-Expression waren 51 % tumorbedingte und 8,5 % nicht tumorbedingte Todesfälle zu vermerken.

Im Hinblick auf das krankheitsfreie Überleben nach Rezidiv (prDFS) wurden 19 % der Patienten zum Studienende zensiert. 43 % der Patienten in der Gruppe mit niedriger SOX2-Expression verstarben an einem oralen Plattenepithelkarzinom, während in der Gruppe mit hoher Expression dieser Anteil 34 % betrug. Ein lokoregionäres Rezidiv trat in der Gesamtgruppe bei 33 % auf – mit nahezu identischen Raten in beiden Gruppen (34 % bei niedriger vs. 32 % bei hoher Expression).

Tabelle 2: Überlebensergebnisse innerhalb der Patientengruppe basierend auf dem H-Score-Schwellenwert für die SOX2-Expression

SOX2			
Eigenschaften / Merkmale	Insgesamt, N = 94¹	≤14, N = 47¹	>14, N = 47¹
Tod aus jeglicher Ursache			
Lebend oder zensiert	27 (29 %)	8 (17 %)	19 (40 %)
Verstorben	67 (71 %)	39 (83 %)	28 (60 %)
Todesursache			
Lebend oder zensiert	27 (29 %)	8 (17 %)	19 (40 %)
Tod durch OSCC ²	57 (61 %)	33 (70 %)	24 (51 %)
Tod durch andere Ursachen	10 (11 %)	6 (13 %)	4 (8,5 %)
prDFS			
Zensiert	18 (19 %)	5 (11 %)	13 (28 %)
Tod durch OSCC ²	36 (38 %)	20 (43 %)	16 (34 %)
Tod durch andere Ursachen	9 (9,6 %)	6 (13 %)	3 (6,4 %)
Lokal-regionales Rezidiv	31 (33 %)	16 (34 %)	15 (32 %)

¹n (%)

²Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

3.3 Überlebensergebnisse in Abhängigkeit von der NANOG-Expression

Tabelle 3 gibt die Überlebensdaten bezogen auf die NANOG-Expression wieder, unterteilt mittels eines H-Score-Grenzwerts von ≤ 15 und > 15. Von den 94 eingeschlossenen Patienten wiesen 48 eine niedrige und 46 eine hohe NANOG-Expression auf. Die Gesamtmortalität betrug wie bei SOX2 71 %. In der Gruppe mit niedriger NANOG-Expression lag die Sterblichkeitsrate bei 77 % (37/48), in der Gruppe mit hoher Expression bei 65 % (30/46). 63 % verstarben in der niedrig exprimierenden Gruppe an einem oralen Plattenepithelkarzinom, 15 % an anderen Ursachen. Bei hoher NANOG-Expression lagen die tumorbedingten Todesursachen bei 59 %, während der Anteil anderer Todesursachen bei 6,5 % lag.

In Bezug auf das krankheitsfreie Überleben nach Rezidiv (prDFS) blieb das Ereignis bei 19 % der Gesamtgruppe bis zum Studienende aus. Die durch ein orales Plattenepithelkarzinom bedingte Mortalität unterschied sich mit 38 % (niedrige Expression) vs. 39 % (hohe Expression) kaum zwischen den Gruppen. Die Rate lokoregionaler Rezidive betrug insgesamt 33 % und war in der Gruppe mit niedriger NANOG-Expression mit 29 % etwas geringer als in der Gruppe mit hoher Expression (37 %).

Tabelle 3: Überlebensergebnisse innerhalb der Patientengruppe basierend auf dem H-Score-Schwellenwert für die NANOG-Expression

NANOG			
Eigenschaften / Merkmale	Insgesamt, N = 94¹	≤15, N = 48¹	>15, N = 46¹
Tod aus jeglicher Ursache			
Lebend oder zensiert	27 (29 %)	11 (23 %)	16 (35 %)
Verstorben	67 (71 %)	37 (77 %)	30 (65 %)
Todesursache			
Lebend oder zensiert	27 (29 %)	11 (23 %)	16 (35 %)
Tod durch OSCC ²	57 (61 %)	30 (63 %)	27 (59 %)
Tod durch andere Ursachen	10 (11 %)	7 (15 %)	3 (6,5 %)
prDFS			
Zensiert	18 (19 %)	9 (19 %)	9 (20 %)
Tod durch OSCC ²	36 (38 %)	18 (38 %)	18 (39 %)
Tod durch andere Ursachen	9 (9,6 %)	7 (15 %)	2 (4,3 %)
Lokal-regionales Rezidiv	31 (33 %)	14 (29 %)	17 (37 %)

¹n (%)

²Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

3.4 Multivariate Cox-Regression zur Risikobewertung auf Basis des SOX2-H-Scores

In Tabelle 4 werden die Hazard Ratios (HR) für das krankheitsfreie Überleben nach Rezidiv (prDFS) und das Gesamtüberleben nach Rezidiv (prOS) dargestellt unter Anwendung des H-Score-basierte Cutoffs für SOX2 (≤ 14 vs. > 14). Jede Zeile nennt einen unabhängigen Einflussfaktor (z. B. Alter, CCI, rT-Stadium, rN-Status, SOX2-Gruppe).

Für das rT-Stadium zeigt sich, dass alle Stadien oberhalb von rT1 (rT2, rT3, rT4 und rTx) ein signifikant erhöhtes Risiko für Krankheitsprogression bzw. Tod aufweisen. So liegt das HR im Fall von rT2 beispielsweise bei 3,51 für prDFS ($p = 0,003$) und 3,56 für prOS ($p = 0,010$). Höhere Stadien (rT3, rT4) zeigen ähnliche oder sogar noch höhere HR-Werte.

Ein positiver oder unbekannter Lymphknotenstatus (rN+/x) erhöht das Risiko für Rezidiv bzw. Mortalität im Vergleich zu rN0 (z. B. HR 2,87 für prOS, $p = 0,001$).

Die SOX2-Expression (H-Score > 14) senkt das Sterberisiko signifikant (HR 0,54, $p = 0,030$) und zeigt eine tendenzielle, jedoch nicht ganz signifikante Verbesserung für das prDFS (HR 0,60, $p = 0,054$).

Tabelle 4: Hazard-Ratios für diverse prognostische Faktoren in Rezidivproben unter Anwendung der H-Score-basierten Grenzwerte von SOX2

Merkmal	prDFS			prOS		
	HR ¹	95% CI	p-value	HR ¹	95% CI	p-value
Alter bei Rezidivdiagnose	1,01	1,00 – 1,02	0,2	1,01	1,00 – 1,02	0,3
CCI score						
0	—	—		—	—	
1 ≤	1,36	0,80 – 2,32	0,3	1,14	0,64 – 2,01	0,7
rT						
rT1	—	—		—	—	
rT2	3,51	1,53 – 8,07	0,003	3,56	1,36 – 9,31	0,01
rT3	3,01	1,22 – 7,46	0,017	5,7	2,09 – 15,5	<0,001
rT4	2,48	1,22 – 5,04	0,012	3,58	1,59 – 8,05	0,002
rTx	2,23	0,97 – 5,12	0,059	2,45	0,98 – 6,15	0,056
rN						
rN0	—	—		—	—	
rN+/x	1,95	1,11 – 3,43	0,021	2,87	1,52 – 5,39	0,001
SOX2_Rezidiv_ H-Score						
≤14	—	—		—	—	
>14	0,6	0,35 – 1,01	0,054	0,54	0,31 – 0,94	0,03

¹HR = Hazard Ratio, CI = Confidence Interval

3.5 Multivariate Cox-Regression zur Risikobewertung auf Basis des NANOG-H-Scores

Tabelle 5 legt die Ergebnisse der Cox-Regression für NANOG in Bezug auf prDFS und prOS sowie die gleichen Kovariablen (z. B. rT, rN, CCI) dar. Das Tumorstadium (rT2, rT3, rT4) erhöht das Risiko für Progression bzw. Tod gegenüber rT1 deutlich, so z. B. HR 4,77 für rT2 beim prDFS ($p < 0,001$). Der Lymphknotenstatus (rN+/x) bleibt auch hier ein signifikanter Faktor (z. B. HR 2,85 für prOS, $p = 0,002$).

Die NANOG-Expression (Cutoff ≤ 15 vs. > 15) zeigt hingegen weder für prDFS (HR 1,11, $p = 0,7$) noch für prOS (HR 1,06, $p = 0,8$) eine Relevanz. Sie ist in diesem Modell somit kein signifikanter Prädiktor.

Tabelle 5: Hazard-Ratios für diverse prognostische Faktoren in Rezidivproben unter Anwendung der H-Score-basierten Grenzwerte von NANOG

Merkmal	prDFS			prOS		
	HR ¹	95% CI	p-value	HR ¹	95% CI	p-value
Alter bei Rezidivdiagnose	1,01	1,00 – 1,02	0,14	1,01	0,99 – 1,02	0,4
CCI score						
0	—	—		—	—	
1 ≤	1,23	0,73 – 2,09	0,4	1	0,57 – 1,75	>0,9
rT						
rT1	—	—		—	—	
rT2	4,77	2,07 – 11,0	<0,001	4,91	1,86 – 13,0	0,001
rT3	3,19	1,25 – 8,17	0,015	5,93	2,08 – 16,9	<0,001
rT4	3,08	1,52 – 6,25	0,002	4,39	1,91 – 10,1	<0,001
rTx	2,49	1,09 – 5,69	0,031	2,79	1,11 – 6,98	0,029
rN						
rN0	—	—		—	—	
rN+/x	1,92	1,08 – 3,43	0,027	2,85	1,48 – 5,46	0,002
NANOG_ Rezidiv_ H-Score						
≤15	—	—		—	—	
>15	1,11	0,67 – 1,85	0,7	1,06	0,61 – 1,86	0,8

¹HR = Hazard Ratio, CI = Confidence Interval

3.6 SOX2-Expression in Primärtumoren vs. Rezidiven

Tabelle 6 vergleicht die SOX2-Expression (in Prozent) zwischen Primärtumoren und Rezidiven, wobei die Gesamtgruppe (n = 94) sowie Untergruppen (eingeteilt nach adjuvanter Therapie) separat betrachtet werden.

Im Gesamtvergleich unterscheidet sich der durchschnittliche prozentuale Wert im Primärtumor (26,63 %) nicht signifikant von jenem im Rezidiv (13,96 %; p = 0,621).

Patienten, die eine Operation mit anschließender Radiotherapie (adjuvante RT) erhielten, weisen im Mittel eine höhere SOX2-Expression im Rezidiv (52,67) auf als im Primärtumor (35,06). Dieses Ergebnis erreicht jedoch keine statistische Signifikanz (p = 0,280).

Bei Patienten mit adjuvanter Radiochemotherapie liegen sowohl Primärtumor- als auch Rezidiv-Medianwerte auf einem eher niedrigen Niveau (2,12 vs. 6,87), ohne signifikanten Unterschied (p = 0,583).

Die Medianwerte im Falle von Operationen ohne adjuvante Therapie (32,75 vs. 16,26) zeigen einen Abfall von Primär- zu Rezidivtumor, ebenfalls ohne statistische Signifikanz ($p = 0,190$) (Tabelle 6).

Tabelle 6: SOX2-Expression in Primärtumoren und Rezidivtumoren, unterteilt nach Therapiemodalität

SOX2			
	Primär, N = 94¹	Rezidiv, N = 94¹	p-value²
Median (IQR)	26,631 (1,832 – 54,559)	13,963 (2,270 – 50,861)	0,621
Fehlend	26	1	
Adjuvante RT			
	Primär, N = 15¹	Rezidiv, N = 15¹	p-value²
Median (IQR)	35,061 (8,521 – 40,421)	52,670 (12,753 – 64,455)	0,28
Fehlend	2	1	
Adjuvante RCT			
	Primär, N = 21¹	Rezidiv, N = 21¹	p-value²
Median (IQR)	2,117 (0,394 – 26,814)	6,871 (0,738 – 14,510)	0,583
Fehlend	7	0	
Nur Chirurgie (ohne adjuvante Therapie)			
	Primär, N = 58¹	Rezidiv, N = 58¹	p-value²
Median (IQR)	32,745 (5,406 – 63,892)	16,262 (2,441 – 45,815)	0,19
Fehlend	17	0	

¹Median (IQR); ²Wilcoxon rank sum test, RT: Radiotherapie, RCT: Radiochemotherapie

3.7 NANOG-Expression in Primärtumoren vs. Rezidiven

Tabelle 7 stellt NANOG (in Prozent) analog zu Tabelle 6 gegenüber. Auffällig ist der deutliche Rückgang der NANOG-Werte im Gesamtvergleich: Von 42,22 (Primärtumor) auf 8,65 (Rezidiv) bei $p < 0,001$. Die Medianwerte bei adjuvanter RT sanken von 42,66 auf 12,12, allerdings ohne Signifikanz ($p = 0,555$). Eine ähnliche Tendenz zeigt sich bei adjuvanter RCT (33,65 vs. 11,48),

ebenfalls jedoch nicht auf signifikantem Niveau ($p = 0,414$). Bei Operation ohne adjuvante Therapie ist die Abnahme von 44,81 auf 7,19 hochsignifikant ($p < 0,001$). Diese Gruppe bildet somit den Haupttreiber des Gesamtvergleichs.

Insgesamt legen die Ergebnisse in Tabellen 6 und 7 dar, dass die SOX2-Expression zwischen Primär- und Rezidivtumor statistisch nicht signifikant variiert, jedoch unter bestimmten Therapiebedingungen (z. B. nach RT) tendenziell ansteigen kann. NANOG hingegen zeigt einen statistisch hochsignifikanten Abfall, insbesondere dann, wenn die Patienten keine adjuvante Radiotherapie oder Radiochemotherapie erhalten haben. Diese Befunde unterstreichen mögliche Therapieeinflüsse auf die Expression von Krebsstammzellen-Markern und deuten darauf hin, dass sich die Tumorbiologie im Verlauf zwischen Erstmanifestation und Rezidiv verändert.

Tabelle 7: NANOG-Expression in Primärtumoren und Rezidivtumoren, unterteilt nach Therapiemodalität

NANOG			
	Primär, N = 94¹	Rezidiv, N = 94¹	p-value²
Median (IQR)	42,221 (8,585 – 57,148)	8,652 (1,177 – 23,368)	<0,001
Fehlend	27	0	
adjuvante RT			
	Primär, N = 15¹	Rezidiv, N = 15¹	p-value²
Median (IQR)	42,663 (22,019 – 46,080)	12,123 (1,431 – 51,833)	0,555
Fehlend	2	0	
adjuvante RCT			
	Primär, N = 21¹	Rezidiv, N = 21¹	p-value²
Median (IQR)	33,654 (1,852 – 43,796)	11,479 (3,231 – 18,331)	0,414
Fehlend	7	0	
Nur Chirurgie (ohne adjuvante Therapie)			
	Primär, N = 58¹	Rezidiv, N = 58¹	p-value²
Median (IQR)	44,814 (15,930 – 61,558)	7,187 (0,943 – 23,241)	<0,001
Fehlend	18	0	

¹Median (IQR); ²Wilcoxon rank sum test, RT: Radiotherapie, RCT: Radiochemotherapie

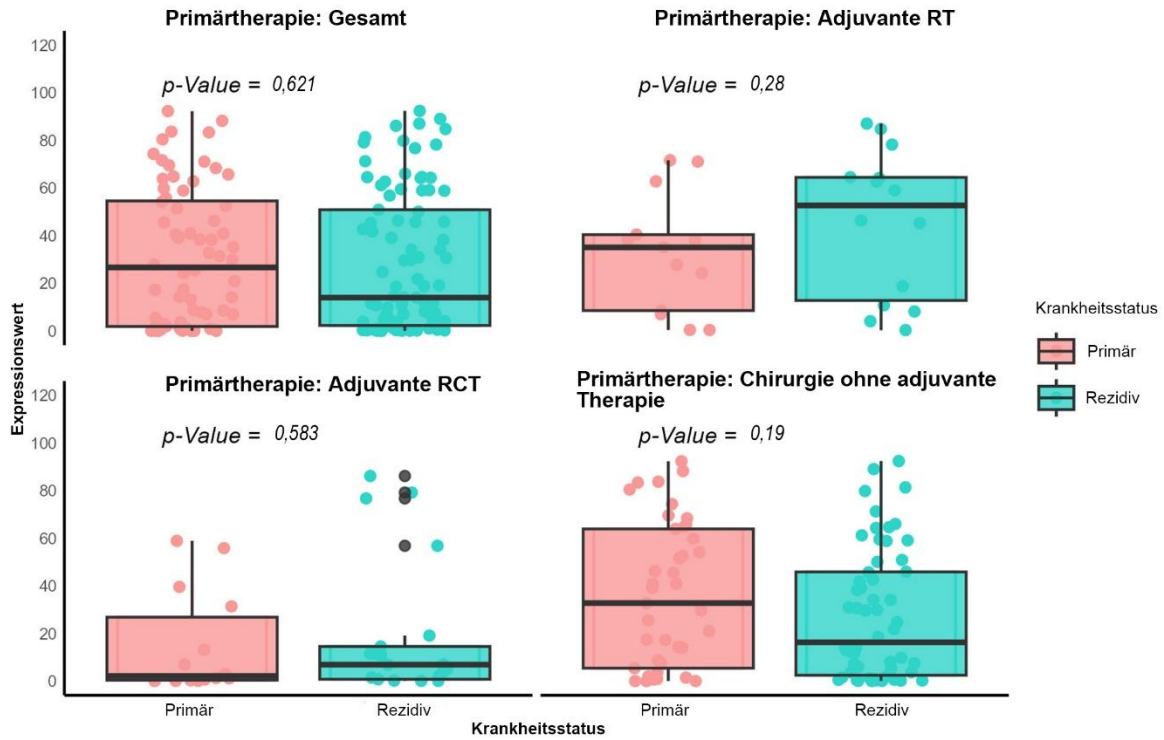
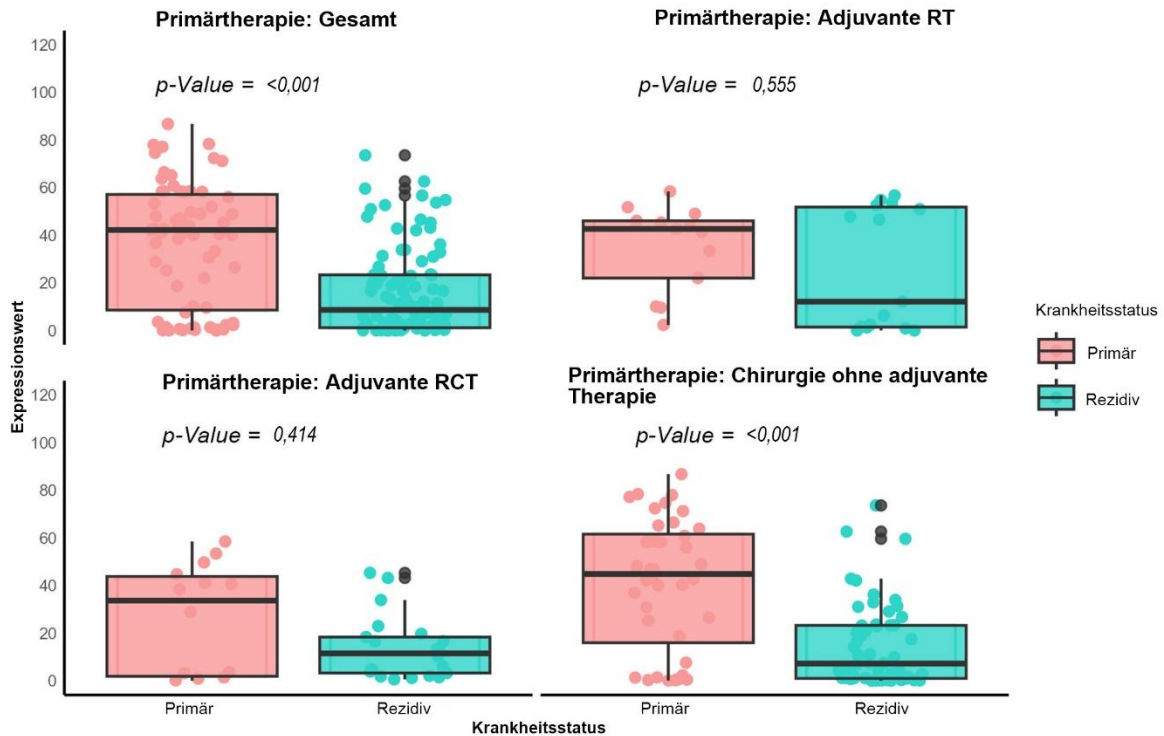
A**Boxplot von SOX2 nach Primärtherapie und Krankheitsstatus****B****Boxplot von NANOG nach Primärtherapie und Krankheitsstatus**

Abbildung 7: Boxplots zum Vergleich der SOX2- (A) und NANOG-Expression (B) zwischen primären und rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen, stratifiziert nach Therapieform. Statistische Unterschiede wurden mithilfe des Wilcoxon-Rangsummentests analysiert.

3.8 Kaplan-Meier-Analyse zur Analyse des prOS und prDFS für SOX2 und NANOG

Die Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 8 (A) zeigt das prOS der Patienten in Bezug auf die SOX2-Expression im Rezidivtumor. Die Einteilung der Patienten erfolgte nach dem H-Score von SOX2 in zwei Kategorien: H-Score ≤ 14 und H-Score > 14 .

Die Diagramme verdeutlichen, dass Patienten mit einer SOX2-Expression über 14 eine deutlich höhere Überlebenswahrscheinlichkeit haben als solche mit einer geringeren SOX2-Expression ($p = 0,013$). Die 95 %-Konfidenzintervalle werden durch die farbigen Schattierungen um die Kurven dargestellt.

Die Kaplan-Meier-Darstellung in Abbildung 6 (B) illustriert das prDFS in Bezug auf die SOX2-Expression im Rezidivtumor. Auch in diesem Fall wurden die Patienten nach ihrem H-Score in zwei Kategorien unterteilt (≤ 14 im Vergleich zu > 14).

Die Kurvenverläufe offenbaren, dass eine erhöhte SOX2-Expression (> 14) mit einem signifikant verbesserten progressionsfreien Überleben korreliert ($p = 0,026$). Bei Patienten mit geringer SOX2-Expression (≤ 14) manifestiert sich eine schnellere Krankheitsprogression, wohingegen Patienten mit erhöhter Expression einen verzögerten Krankheitsverlauf aufweisen.

Die vorliegenden Befunde deuten darauf hin, dass eine erhöhte SOX2-Expression im Rezidivtumor möglicherweise als prognostischer Indikator für ein verlängertes Überleben und eine verlängerte Zeit ohne Fortschreiten der Krankheit herangezogen werden könnte.

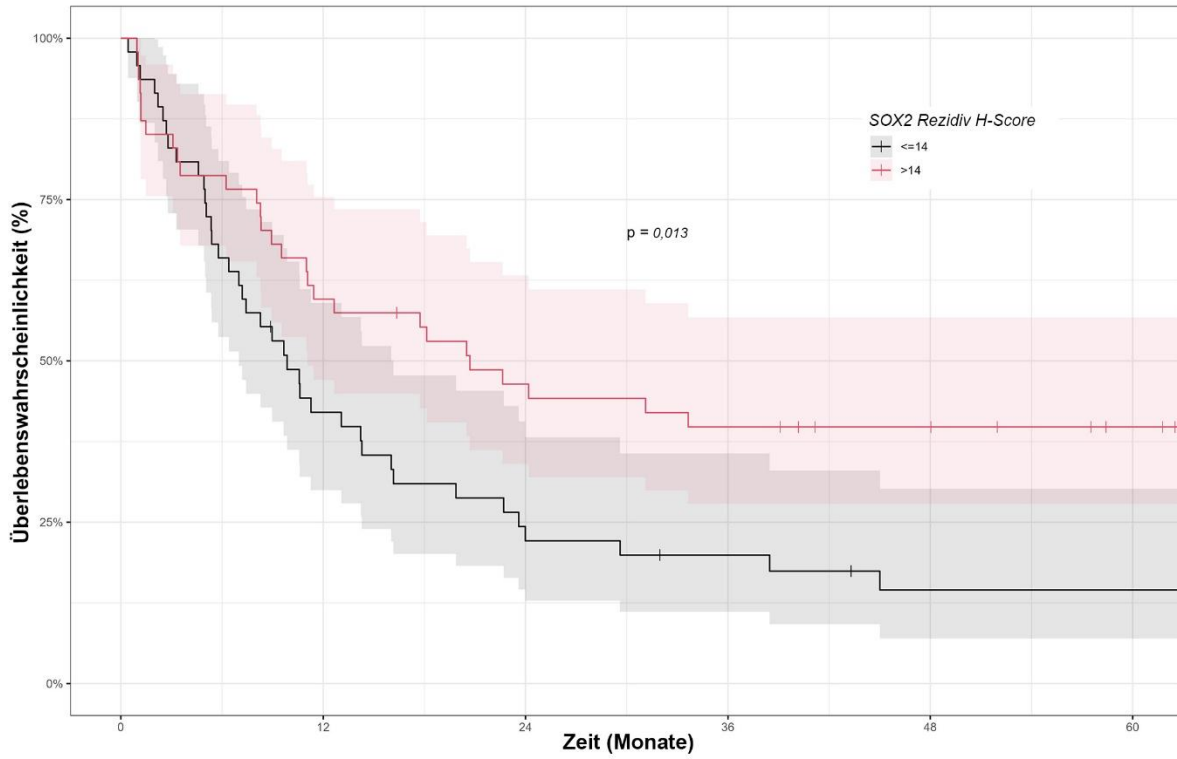
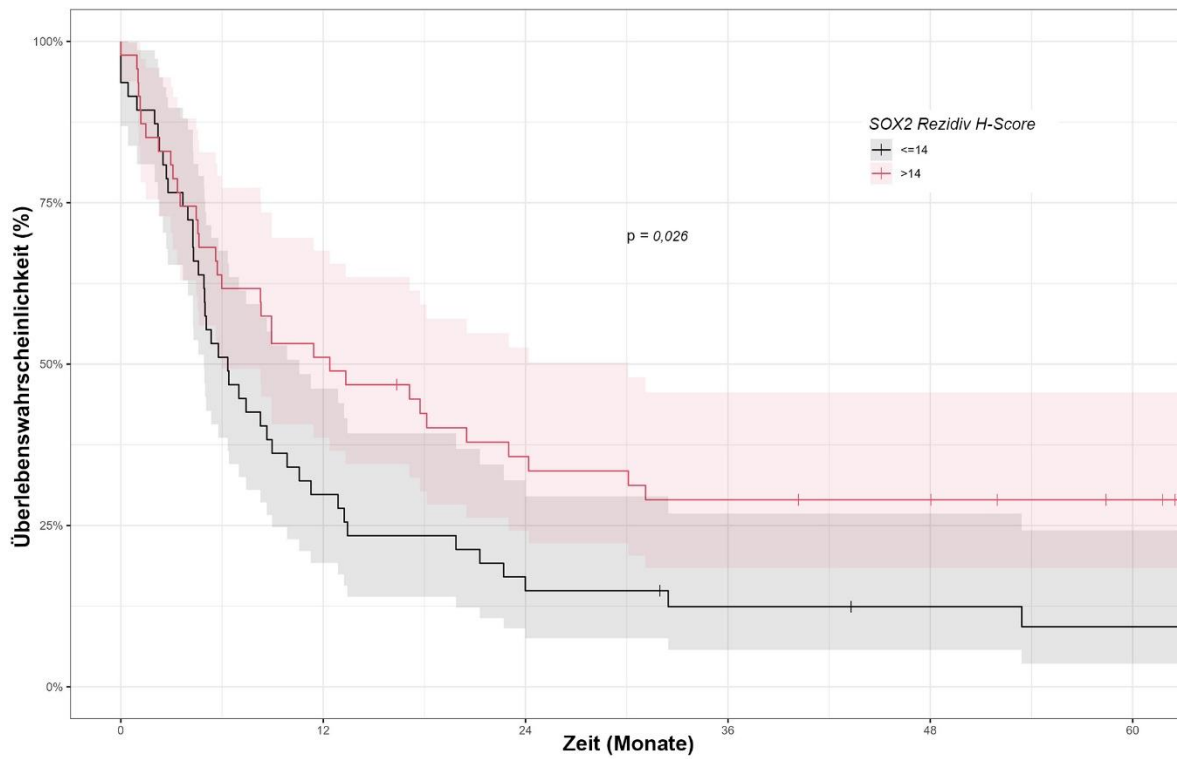
A**SOX2 - prOS****B****SOX2 - prDFS**

Abbildung 8: Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Darstellung des Einflusses der SOX2-Expression auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit rezidivierendem oralem Plattenepithelkarzinom. (A) Darstellung des Gesamtüberlebens nach Rezidiv (prOS): Patienten mit niedriger SOX2-Expression (H-Score ≤ 14) zeigen ein signifikant schlechteres Überleben. (B) Darstellung des krankheitsfreien Überlebens nach Rezidiv (prDFS): Auch hier ist eine niedrigere SOX2-Expression mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert.

Die nachfolgende Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 9 (A) illustriert das prOS der Patienten in Abhängigkeit von der NANOG-Expression im Rezidivtumor und stellt damit den Einfluss der NANOG-Expression auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bei rezidivierendem oralem Plattenepithelkarzinom dar. Die Einteilung der Patienten erfolgte in zwei Kategorien basierend auf dem H-Score von NANOG (H-Score ≤ 15 sowie H-Score > 15).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt im Laufe der Zeit in beiden Gruppen. Die Grafik verdeutlicht, dass Patienten mit einer erhöhten NANOG-Expression (> 15) eine geringfügig optimierte Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen, jedoch ohne statistisch signifikante Differenz ($p = 0,25$). Die farbigen Schattierungen um die Kurven symbolisieren die Konfidenzintervalle von 95 %.

In Abbildung 9 (B) wird das prDFS anhand der Kaplan-Meier-Kurve dargestellt, wobei die NANOG-Expression im Rezidivtumor berücksichtigt wird. In diesem Fall wurden die Patienten ebenfalls nach dem H-Score in zwei Gruppen eingeteilt (≤ 15 vs. > 15). Die Kurvenverläufe der Abbildung 9 (B) zeigen eine vergleichbare Tendenz zu Abbildung 9 (A) auf: Eine erhöhte Expression von NANOG (> 15) ist mit einer minimal besseren Prognose verbunden, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,34$).

In beiden Analysen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen, was darauf hindeutet, dass die NANOG-Expression im Rezidivtumor keinen entscheidenden Einfluss auf das postoperative Gesamt- oder progressionsfreie Überleben hat.

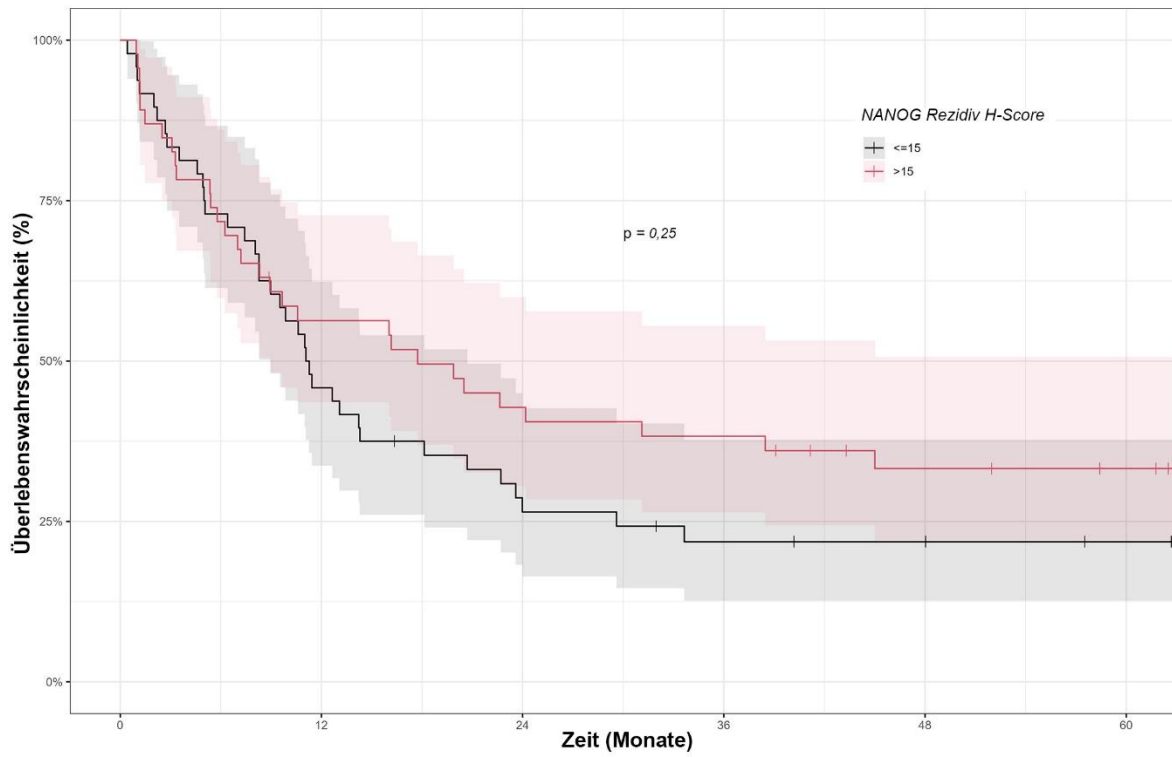
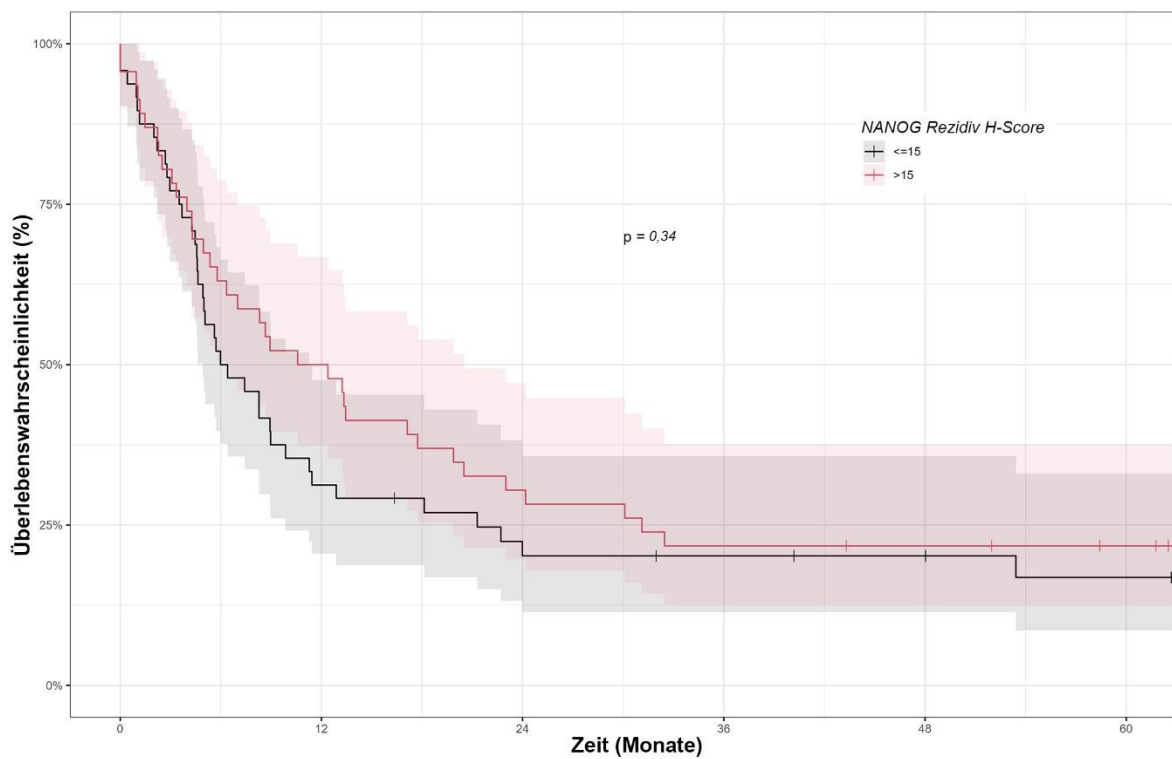
A**NANOG - prOS****B****NANOG - prDFS**

Abbildung 9: Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Darstellung des Einflusses der NANOG-Expression auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bei rezidivierendem oralen Plattenepithelkarzinom. (A) Die Kurven zum Gesamtüberleben nach Rezidiv (prOS) zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom NANOG-Expressionsniveau (H-Score ≤ 15 vs. > 15). (B) Auch die Kurven zum krankheitsfreien Überleben nach Rezidiv (prDFS) zeigen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die NANOG-Expression.

3.9 Zusammenfassende Betrachtung

Insgesamt lassen die Daten darauf schließen, dass SOX2 als möglicher prognostischer Marker für das postrezidivierende Überleben infrage kommt, da eine höhere Expression mit besseren prOS- und prDFS-Werten assoziiert war. NANOG hingegen erwies sich in den multivariaten Analysen als nicht signifikant für das Überleben, zeigte jedoch einen signifikanten Abfall der Expression beim Übergang vom Primärtumor zum Rezidiv, was eine potenzielle Veränderung der Tumorbiologie nahelegt. Darüber hinaus werden das rT-Stadium und der Lymphknotenstatus als wesentliche prognostische Faktoren in Bezug auf das Krankheits- und Gesamtüberleben nach Rezidivdiagnose bestätigt. Die gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung einer umfassenden Analyse von Molekularmarkern im Kontext von rezidivierendem oralen Plattenepithelkarzinom, um potenzielle therapeutische Zielstrukturen und prognostische Biomarker weiter zu identifizieren.

4. Diskussion

Rezidivierende orale Plattenepithelkarzinome zeigen sich in der klinischen Praxis häufig herausfordernder als der Primärtumor. Grund hierfür ist, dass rezidivierende Tumoren oft signifikante Unterschiede in ihren biologischen Merkmalen im Vergleich zum ursprünglichen Tumor aufweisen. Die genauen Ursachen und Mechanismen, die für diese Veränderungen verantwortlich sind, sind jedoch bis dato noch nicht abschließend geklärt [181]. Trotz der kontinuierlichen Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten in den letzten Jahren bleibt die Prognose bei Patienten mit rezidivierenden Plattenepithelkarzinomen nach wie vor ungünstig. Die Überlebensraten sind niedrig und zahlreiche Patienten erleiden erneut Rezidive. In Anbetracht dessen sind verlässliche Biomarker, die den Krankheitsverlauf vorhersagen können, von besonderer Bedeutung. Durch diese wäre es möglich, individuelle Therapiekonzepte effektiver anzupassen und langfristig die Patientenversorgung erheblich zu verbessern [194; 195].

Das Auftreten von Lymphknotenmetastasen im Halsbereich ist mit einer schlechteren Prognose verbunden und erschwert das Management von rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen [196; 197]. Eine höhere Tumorinvasionstiefe geht mit einem erhöhten Risiko für Lymphknotenmetastasen, Tumorrezidive und einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit beim oralen Plattenepithelkarzinom im Frühstadium einher [198]. Patienten mit rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen haben häufig begrenzte Therapieoptionen und eine reduzierte Überlebensrate, was eine genauere Untersuchung der Expressionsmuster relevanter Biomarker in rezidivierenden Tumoren erforderlich macht [199].

Die zunehmende Anzahl an Nachweisen betont die Komplexität rezidivierender Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, welche häufig ein aggressiveres biologisches Verhalten und eine ungünstigere Überlebensprognose im Vergleich zu Primärtumoren zeigen. Die Studie von Borsetto et al. untersuchte bedeutende prognostische Faktoren bei lokal begrenzten Rezidiven oraler Plattenepithelkarzinome und zeigte auf, dass die Tumorgöße bei der Erstdiagnose, die Ausdehnung des Rezidivs sowie positive Resektionsränder während der primären Operation entscheidende Vorhersagefaktoren für eine niedrige Gesamtüberlebensrate sind. Die vorliegenden Befunde verdeutlichen die klinische

Problematik rezidivierender oraler Plattenepithelkarzinome, da Patienten mit ausgedehnten lokoregionären Rezidiven eine deutlich geringere Überlebensrate aufweisen als solche mit isolierten lokalen Rezidiven [200].

Krebsstammzellen spielen eine zentrale Rolle bei der Tumorentstehung, Tumorentwicklung, Metastasierung und Rezidivbildung. Aufgrund ihrer Selbsterneuerungsfähigkeit und ihrer Fähigkeit, sich in verschiedene Tumorzelltypen zu differenzieren, stellen sie einen wichtigen Ansatzpunkt für therapeutische Strategien dar [150]. Die abnorme Expression der Transkriptionsfaktoren SOX2, NANOG und OCT4 beeinflusst unterschiedliche Prozesse der Tumorentstehung und Metastasierung [152; 153; 154; 155].

SOX2 wurde als zentrales Onkogen im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle identifiziert. Es ist mit Tumorproliferation, Metastasierung, Therapieresistenz sowie der Förderung der EMT assoziiert [152; 157; 158].

NANOG ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von Krebsstammzellen. Es reguliert die Zellproliferation über Cyclin-D-Interaktionen, senkt die Expression von E-Cadherin, um die Zellmigration zu fördern und unterdrückt p53, um Apoptose zu verhindern [167]. Eine hohe Expression dieser Marker korreliert häufig mit erhöhter Tumoraggressivität und ungünstigen klinischen Verläufen [176; 177].

Die Rolle pluripotenter Transkriptionsfaktoren wie insbesondere SOX2 und NANOG wurde in Primärtumoren oraler Plattenepithelkarzinome umfassend untersucht. Unsere Studie befasst sich jedoch gezielt mit ihrer prognostischen Bedeutung beim rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom und konzentriert sich ausschließlich auf Tumoren der Mundhöhle. Diese Differenzierung ist entscheidend, da frühere Untersuchungen häufig Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs aus verschiedenen anatomischen Regionen – darunter Oropharynx, Mundhöhle und Larynx – einbezogen haben, welche möglicherweise unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweisen [154; 177; 183; 189; 201].

Unsere Ergebnisse stehen in deutlichem Gegensatz zur vorherrschenden Literatur, die eine hohe Expression pluripotenzassoziiierter Transkriptionsfaktoren (NANOG und SOX2) häufig mit einem erhöhten metastatischen Potenzial von Tumorzellen in Verbindung bringt. Im Kontext

des rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinoms beobachteten wir jedoch, dass eine erhöhte SOX2-Expression mit einer besseren Prognose korreliert, einschließlich einer verbesserten prOS und prDFS. Diese Diskrepanz könnte auf die unterschiedlichen biologischen Eigenschaften rezidivierender im Vergleich zu primären Tumoren zurückzuführen sein, was darauf hindeutet, dass Marker wie SOX2 je nach evolutionärem Verlauf eines Tumors unterschiedlich wirken können. Die Studie ist insbesondere für die Forschung zu Krebsstammzell-Markern von Bedeutung, da sie hervorhebt, dass die rezidivspezifische Tumorbiologie die prognostische Aussagekraft dieser Marker erheblich beeinflussen kann.

4.1 Prognostische Bedeutung von SOX2 beim rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom

Züllig et al. untersuchten die Proteinexpression von SOX2 bei oralen Plattenepithelkarzinomen im Frühstadium und analysierten deren Zusammenhang mit okkulten Lymphknotenmetastasen. In ihrer Studie wurden 120 Fälle von T1/T2-oralen Plattenepithelkarzinomen eingeschlossen und die SOX2-Expression mittels Immunhistochemie anhand eines Intensitäts-/Reaktivitätsscores (IRS) quantifiziert. Es wurde in dieser Studie festgehalten, dass eine erhöhte SOX2-Expression signifikant mit einem negativen Lymphknotenstatus assoziiert war ($p = 0,001$), wobei eine Sensitivität von 95,6 % und ein negativer Vorhersagewert von 92,3 % erreicht wurden. Die Resultate weisen darauf hin, dass die SOX2-Expression möglicherweise als Indikator für ein verringertes Metastasierungspotenzial bei oralen Plattenepithelkarzinomen im Frühstadium dienen könnte [151]. Im Unterschied dazu lag der Fokus unserer Untersuchung auf dem rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom. Die Untersuchung offenbarte eine Verbindung zwischen einer erhöhten SOX2-Expression und einer verbesserten prOS sowie prDFS. Obwohl Züllig et al. keine bedeutende Auswirkung der SOX2-Expression auf die Rezidivrate feststellten, deuten unsere Befunde darauf hin, dass SOX2 über das frühe Stadium des oralen Plattenepithelkarzinoms hinaus prognostische Relevanz behält und weiterhin die Patientenergebnisse bei Rezidiven beeinflusst [151]. Ein wesentlicher Unterschied zwischen unserer Untersuchung und der Studie von Züllig et al. besteht in der Zusammensetzung der untersuchten Kollektive. Während Züllig et al. ausschließlich Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen im Frühstadium

(T1/T2) ohne nachgewiesenen Lymphknotenbefall analysierten, basiert unsere Analyse auf einer Kohorte mit rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen, bei der eine vollständiger Behandlungsverlauf dokumentiert wurde. Möglicherweise liegt dieser Unterschied darin begründet, dass unsere Resultate die prognostische Relevanz von SOX2 für das Langzeitüberleben betonen, während ihre Untersuchung die Bedeutung von SOX2 bei der Prävention früher Metastasen in den Vordergrund stellt. Züllig et al. nahmen an, dass die erhöhte Expression von SOX2 bei frühen Fällen des oralen Plattenepithelkarzinoms mit chromosomalen Verstärkungen in der 3q26-Region in Verbindung stehen könnte, was ein häufiges genetisches Ereignis verschiedener Plattenepithelkarzinom-Typen ist. In unserer Untersuchung hingegen wurden keine Variationen der Kopienzahl von SOX2 untersucht. Die fortbestehende prognostische Relevanz von SOX2 bei rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen legt nahe, dass seine Expression möglicherweise über genetische Verstärkung hinaus durch weitere regulatorische Mechanismen beeinflusst wird [151].

Du et al. untersuchten die SOX2-Expression bei Plattenepithelkarzinomen der Zunge mit histologisch lymphknotennegativen (pN0) Tumoren und berichteten über eine SOX2-Positivität in 62,2 % der Fälle. Ihre Ergebnisse assoziierten die SOX2-Expression mit einer größeren Tumorgroße ($p = 0,042$) sowie signifikant schlechteren Gesamt-, krebsspezifischen und krankheitsfreien Überlebensraten ($p = 0,004, 0,004$ bzw. $0,001$). Eine multivariate Analyse bestätigte SOX2 als unabhängigen Prädiktor für eine ungünstige Prognose ($p = 0,032, 0,035$ bzw. $0,011$). Im Gegensatz dazu zeigte unsere Studie, dass eine SOX2-Überexpression im rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom mit verbessertem prOS und prDFS korrelierte, was darauf hindeutet, dass seine prognostische Bedeutung zwischen primärem und rezidivierendem oralen Plattenepithelkarzinom unterschiedlich ist. Die umgekehrte Korrelation in unserer Kohorte deutet darauf hin, dass die Rolle von SOX2 kontextabhängig sein könnte und durch Tumorprogression sowie postrezidiväre Tumordynamiken beeinflusst wird. Zudem konzentrierten sich Du et al. auf den Primärtumor, ohne Therapieansprechen oder Rezidive zu berücksichtigen, während unsere Studie speziell die SOX2-Expression in einem rezidivierenden Setting untersucht, was die abweichenden prognostischen Implikationen erklären könnte [202].

Steen et al. führten eine eingehende Untersuchung der Expression von SOX2 und SOX9 in einer umfangreichen Kohorte von oralen Plattenepithelkarzinomen durch, die sowohl primäre als auch rezidivierende Tumoren sowie korrespondierende Lymphknotenmetastasen einschloss. Die Untersuchung ergab, dass die SOX2-Expression in rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu primären Tumoren signifikant erhöht war ($p < 0,001$), wohingegen die SOX9-Expression in Lymphknotenmetastasen deutlich reduziert war. Dies widerspricht unserer Untersuchung, in der eine erhöhte SOX2-Expression mit einem verbesserten prOS und prDFS in Verbindung gebracht wurde, während die SOX9-Expression nicht analysiert wurde [157].

Steen et al. entdeckten ferner, dass Patienten mit dem SOX2^{low}SOX9^{high}-Phänotyp eine signifikant schlechtere Gesamtüberlebensrate zeigten und dass dieses Muster als unabhängiger prognostischer Faktor validiert wurde. Im Gegensatz dazu offenbarte unsere Untersuchung, dass SOX2 allein einen vorteilhaften prognostischen Marker im rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom darstellte, was darauf hindeutet, dass die Interaktion zwischen SOX2 und SOX9 möglicherweise kontextabhängig ist. Zusätzlich betonte die Untersuchung von Steen et al. die klinische Bedeutung der SOX-Genexpression im oralen Plattenepithelkarzinom und unterstrich die Dringlichkeit weiterer Untersuchungen der molekularen Mechanismen, welche die Regulation von SOX2 und SOX9 beeinflussen [157]. Unsere Befunde bestätigen diese Sichtweise und betonen darüber hinaus die Bedeutung von SOX2 als möglichem Biomarker für verbesserte Überlebensprognosen bei erneut auftretendem oralen Plattenepithelkarzinom. Die Ergebnisse von Steen et al. gewähren bedeutende Einblicke in die Dynamik der Expression von SOX2 und SOX9 in verschiedenen Stadien des oralen Plattenepithelkarzinoms. Ihre Untersuchung deutet auf eine komplexe Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren bei der Tumorprogression und Metastasierung hin, während unsere Befunde die Hypothese stützen, dass eine Überexpression von SOX2 in rezidivierendem orale Plattenepithelkarzinom mit einer günstigeren Prognose verbunden ist. Es bedarf zukünftig weiterer Untersuchungen, um festzustellen, ob die prognostische Aussagekraft von SOX2 durch seine gemeinsame Expression mit SOX9 und weiteren molekularen Regulatoren beeinflusst wird [157]. Es sind außerdem zusätzliche Forschungsanstrengungen erforderlich,

um zu klären, ob sich die funktionelle Bedeutung von SOX2 im Verlauf der Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms verändert. Die Untersuchung, ob gezielte Modulationen der Expression von SOX2 und SOX9 im Rezidiv des oralen Plattenepithelkarzinoms möglich sind, könnte wichtige Strategien für die Patientenauswahl und personalisierte Therapieansätze eröffnen [157].

Freier et al. zeigten, dass eine SOX2-Genamplifikation in 52 % der oralen Plattenepithelkarzinome auftrat. Sie identifizierten die SOX2-Genamplifikation mithilfe von CGH und FISH, fanden jedoch keine signifikante Korrelation mit dem Tumorstadium oder dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Unsere Studie befasste sich zwar nicht mit der genetischen Amplifikation, konzentrierte sich jedoch auf die SOX2-Proteinexpression im rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom. Dabei stellten wir fest, dass eine erhöhte SOX2-Proteinexpression signifikant mit verbessertem prOS und prDFS korrelierte, was auf eine potenzielle prognostische Bedeutung im rezidivierenden Krankheitsverlauf hinweist. Ein besseres Verständnis des Zusammenspiels zwischen SOX2-Amplifikation und Proteinexpression könnte wertvolle Erkenntnisse für gezielte Therapien sowie für die Rolle von SOX2 als Biomarker bei der Progression und dem Rezidiv des oralen Plattenepithelkarzinoms liefern [203].

Zhu et al. betonten daneben die Rolle von SOX2 beim kolorektalen Karzinom, wo es über β -Catenin-Aktivierung und Beclin1-vermittelte Autophagie krebstammzellartige Eigenschaften, Chemoresistenz und die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) fördert. Ihre Ergebnisse stehen im Kontrast zu unserer Studie über rezidivierende orale Plattenepithelkarzinome, in der eine SOX2-Überexpression mit einem verbesserten Überleben einherging, was auf eine tumorspezifische und lokalisationsabhängige Funktion hinweist. Während SOX2 beim kolorektalen Karzinom durch autophagieabhängige Mechanismen zur Therapieresistenz beiträgt, bleibt sein Einfluss auf Rezidive und die Progression oraler Plattenepithelkarzinome weiter zu erforschen [204].

Yang et al. zeigten, dass eine SOX2-Überexpression beim kleinzelligen Lungenkarzinom mit fortgeschrittenem Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen und einem schlechteren

Überleben zusammenhing. Diese Ergebnisse stehen im Spannungsfeld zu unserer Studie über das rezidivierende orale Plattenepithelkarzinom, in der eine SOX2-Überexpression mit einem verbesserten post-rezidiven Überleben assoziiert war. Zudem identifizierten Yang et al. eine Hochrisiko-Untergruppe mit einer SOX2/FGFR1-Koexpression, was auf onkogene Interaktionen hinweist, die in unserer Studie nicht untersucht wurden. [205].

4.2 Prognostische Bedeutung von NANOG beim rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom

NANOG ist ebenfalls entscheidend an der Aufrechterhaltung von Krebsstammzellen und der Tumorprogression beteiligt [180; 184; 206]. Studien zeigen, dass die NANOG-Expression mit der Progression oraler Plattenepithelkarzinome, Lymphknotenmetastasen und Therapieresistenz assoziiert ist [168; 184]. Ähnlich wie bei SOX2 bleibt jedoch die genaue Rolle von NANOG in der Entwicklung des oralen Plattenepithelkarzinoms sowie seine prognostische Bedeutung weiterhin ungeklärt [36]. Während einige Untersuchungen tumorfördernde Funktionen nahelegen, deuten andere auf tumorsuppressive Eigenschaften hin [168; 180].

Eine Forschungsgruppe untersuchte die Regulation von NANOG im oralen Plattenepithelkarzinom und zeigte, dass einer starken Proteinexpression eine Hochregulation der mRNA vorausging, was auf eine posttranskriptionale Kontrolle durch miRNAs (miR-34a, miR-145) und lncRNAs (RoR, miR-145) hindeutet. Unsere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass die NANOG-Expression hauptsächlich in der frühen Tumorprogression eine Rolle spielt und weniger bei der Rezidiventwicklung, da in unserer Studie eine starke NANOG-Expression nicht mit dem Überleben bei rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen verbunden war. Zudem zeigten die Autoren eine Verbindung zwischen NANOG, miR-145 und RoR auf, was ein komplexes regulatorisches Netzwerk verdeutlicht, das in unserer Studie nicht untersucht wurde [184].

Eine weitere Forschungsgruppe stellte fest, dass NANOG und Midkine in hochgradigen und fortgeschrittenen oralen Plattenepithelkarzinomen signifikant überexprimiert waren und mit einer schlechten Prognose im Zusammenhang standen. Im Gegensatz dazu zeigte unsere Studie zu rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen, dass eine solche Korrelation nicht

besteht. Darüber hinaus war in der genannten Studie eine hohe NANOG-Expression mit positiven Halslymphknotenmetastasen assoziiert, während in unserer Studie eine solche Verbindung nicht festgestellt werden konnte, was möglicherweise auf Unterschiede in den Patientenkollektiven zurückzuführen ist. Besonders hervorzuheben ist, dass Ergebnisse der Forschungsgruppe die NANOG/Midkine-Koexpression als starken prognostischen Marker identifizierten, was in unserer Untersuchung nicht analysiert wurde [173].

Die Ergebnisse von Kashyap et al. decken sich daneben nicht mit unserer Studie, da sie NANOG als einen zentralen Treiber der oralen Plattenepithelkarzinomprogression identifizierten und dessen Überexpression mit Tumoraggressivität, Lymphknotenmetastasen und Cisplatinresistenz in Verbindung brachten. Sie zeigten, dass NANOG onkogene Faktoren wie c-Myc, Slug, E-Cadherin und Oct-4 transkriptionell reguliert, wodurch seine Rolle in der Krebsstammzellbiologie weiter gestärkt werde. In unserer Studie zeigte sich kein Zusammenhang zwischen NANOG-Expression und postrezidivem Überleben bei rezidivierenden Tumoren. Das könnte bedeuten, dass NANOG eher in Primärtumoren oder frühen Krankheitsstadien eine Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass die Herunterregulation von NANOG in oralen Plattenepithelkarzinomen die Zellen empfindlicher gegenüber Chemotherapie macht. Das unterstützt seine mögliche Rolle in der Therapieresistenz [168].

Die prognostische Bedeutung von NANOG scheint von Stadium und Kontext der Progression oraler Plattenepithelkarzinome abzuhängen. Lee et al. fanden heraus, dass eine hohe NANOG-Expression in primären oralen Plattenepithelkarzinomen mit einem schlechten Überleben, fortgeschrittenem Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen und hohem histologischen Grad in Verbindung stand. Im Gegensatz dazu wurde in unserer Studie keine signifikante Assoziation zwischen NANOG-Expression und dem Überleben bei rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen festgestellt, was darauf hindeutet, dass seine Rolle eher bei der Tumorinitiation als bei der Rezidiventwicklung von Bedeutung sein dürfte.

Ihre Studie berichtete außerdem, dass die Koexpression von NANOG und mutiertem p53 das Überleben signifikant verschlechterte, was auf einen möglichen synergistischen Effekt hinweist, der in unserer Analyse nicht untersucht wurde. Zudem wurde CD44 mit

Tumorinvasion und -progression in Verbindung gebracht, jedoch nicht als unabhängiger Prädiktor für das Überleben identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass der prognostische Einfluss von NANOG eher von umfassenden molekularen Wechselwirkungen abhängt als von seiner alleinigen Expression im rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom. Es legt nahe, dass zusätzliche Faktoren wie mutiertes p53 oder CD44 erforderlich sein könnten, um seinen Einfluss auf das Tumorverhalten zu verstärken [182].

Bourguignon et al. identifizierten das HA-CD44v3-Signal als einen zentralen Regulator der Krebsstammzell-Funktionen in Kopf-Hals-Tumoren, indem es die nukleäre Translokation von SOX2, OCT4 und NANOG förderte und die Expression von miR-302 steigerte. Dies verstärkte die Selbsterneuerung, klonale Expansion und Cisplatinresistenz. Während unsere Studie nicht die HA-CD44-Interaktionen untersuchte, konzentrierte sie sich auf die prognostische Bedeutung von SOX2 und NANOG im rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom, wobei eine SOX2-Überexpression mit einem besseren Überleben korrelierte – im Gegensatz zu seiner tumorfördernden und therapieresistenten Rolle in primären Kopf-Hals-Tumoren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Funktion von SOX2 vom Krankheitsstadium abhängen könnte: Während es in der frühen Tumorentstehung als onkogener Treiber wirkt, könnte es im rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom als positiver prognostischer Marker dienen [154].

Zudem fanden Bourguignon et al. heraus, dass die Blockade von miR-302 die HA-CD44-induzierten Krebsstammzell-Eigenschaften störte, was zu verringerter Tumorigenität und erhöhter Chemosensitivität führte. Obwohl unsere Studie keine miRNA-Regulation untersuchte, sollte zukünftige Forschung prüfen, ob miR-302 oder andere stammzellassoziierte miRNAs zur prognostischen Rolle von SOX2 im rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom beitragen [154]. Zusammenfassend besitzt NANOG im rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom keine eigenständige prognostische Bedeutung; sein Einfluss scheint vielmehr auf frühe Tumorstadien begrenzt zu sein.

4.3 Diskrepanz in der Literatur und Meta-Analysen

Insgesamt stimmt die bestehende Literatur zur SOX2-Expression im oralen Plattenepithelkarzinom nicht mit unseren Ergebnissen überein, da frühere Studien widersprüchliche oder gegensätzliche prognostische Implikationen berichtet haben. Allerdings decken sich unsere Ergebnisse mit früheren Forschungen zu anderen Krebsarten wie Ösophagus- und Lungenkarzinomen. In diesen Malignomen wurde eine höhere SOX2-Expression mit einer besseren Prognose in Verbindung gebracht – ähnlich unserer Beobachtung, dass eine erhöhte SOX2-Expression im rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom mit einem signifikant verbesserten prOS ($p = 0.013$) und prDFS ($p = 0.026$) assoziiert ist, was auf eine potenziell günstige prognostische Rolle hindeutet [207; 208; 209].

Eine Meta-Analyse zur SOX2-Expression beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom unterstützt diese Erkenntnisse und zeigte, dass SOX2 ein positiver prognostischer Biomarker ist. Eine höhere SOX2-Expression war signifikant mit einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert (HR = 0,65; 95 % CI: 0,47–0,89; $p = 0,007$). Zudem wurde festgestellt, dass SOX2 häufiger beim Plattenepithelkarzinom als beim Adenokarzinom hochreguliert ist (gepoolte OR = 5,26; $p = 0,040$). Eine weitere systematische Übersichtsarbeit und Meta-Analyse bestätigte diese Ergebnisse und zeigte, dass sowohl die SOX2-DNA-Amplifikation als auch die Proteinexpression signifikant mit einem besseren Gesamtüberleben beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom assoziiert waren (HR = 0,732; $p = 0,004$ für DNA-Amplifikation; HR = 0,579; $p = 0,025$ für Proteinexpression). Zudem wurden SOX2-Veränderungen signifikant mit dem Rauchstatus (OR = 2,830; $p = 0,011$ für DNA-Amplifikation; OR = 2,245; $p = 0,048$ für Proteinexpression) und der Plattenepithelkarzinom-Histologie (OR = 16,530; $p < 0,001$ für DNA-Amplifikation; OR = 5,437; $p < 0,001$ für Proteinexpression) in Verbindung gebracht [208; 209].

Ähnlich wurde beim Ösophagus-Plattenepithelkarzinom eine hohe SOX2-Expression signifikant mit einem besseren Gesamtüberleben verknüpft ($p = 0,021$). Zudem wurde eine höhere SOX2-Expression mit einem niedrigeren N-Stadium ($p = 0,034$), einer besseren Differenzierung ($p = 0,003$) und einer höheren Ki-67-Expression ($p = 0,001$) in Verbindung

gebracht [207]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SOX2 eine günstige prognostische Rolle im Ösophagus-Plattenepithelkarzinom spielen könnte.

Zusammenfassend unterstreichen diese Ergebnisse die tumorspezifische Rolle von SOX2 und bekräftigen seine positive prognostische Bedeutung bei Lungen- und Ösophagus-Plattenepithelkarzinomen. In Bezug auf das orale Plattenepithelkarzinom scheint seine Rolle jedoch nicht abschließend geklärt zu sein, weshalb weitere Forschung erforderlich ist, um die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen.

4.4 NANOG und SOX2 in der Therapieresistenz

NANOG spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion von Radioresistenz in Tumorzellen, indem es DNA-Reparaturmechanismen verstärkt und stammzellähnliche Eigenschaften fördert. Die gezielte Hemmung von NANOG und seinen assoziierten Signalwegen könnte neue Ansätze zur Verbesserung der Behandlungsergebnisse bei Tumoren bieten [179; 210].

Eine Überexpression von NANOG wird mit Cisplatinresistenz im oralen Plattenepithelkarzinom in Verbindung gebracht. Tumorzellen mit induzierter Cisplatinresistenz zeigen eine erhöhte NANOG-Expression [171].

Die Rolle von SOX2 in der Radioresistenz bleibt komplex, da Studien widersprüchliche Ergebnisse liefern. Während einige Untersuchungen darauf hindeuten, dass SOX2 die Wirkung der Bestrahlung verstärkt und somit die Prognose von Patienten unter Radiotherapie verbessert, gibt es auch Hinweise darauf, dass die Stilllegung von SOX2 einen radioresistenten Phänotyp induzieren kann [178].

Im Kontext von rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen zeigte unsere Studie, dass die SOX2-Expression in rezidivierenden Tumoren von Patienten, die eine adjuvante Strahlentherapie erhalten hatten, erhöht war. Dies legt nahe, dass SOX2 eine Rolle bei der Reaktion des Tumors auf die Strahlentherapie spielen könnte. Die gezielte Hemmung von SOX2 könnte möglicherweise dazu beitragen, Resistenzen gegen Radio- und Chemotherapie zu überwinden. Zu den Strategien gehören die Stilllegung der SOX2-Expression oder die Unterbrechung der zugehörigen Signalwege, wie der β -Catenin- und Hedgehog-Signalwege, um die Wirksamkeit der Behandlung zu verbessern [211; 212; 213].

Die unterschiedlichen Rollen von SOX2 im einerseits primären und andererseits rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom deuten auf eine komplexe, kontextabhängige Funktion hin. Eine Hypothese hierzu ist, dass eine erhöhte SOX2-Expression im Rezidiv möglicherweise einen Zellzustand widerspiegelt, der stärker differenziert und weniger aggressiv ist, was zu einer besseren Prognose für die Patienten beitragen könnte. Alternativ könnte SOX2 an der Aktivierung zellulärer Signalwege beteiligt sein, die die Sensitivität gegenüber Behandlungen während des Rezidivs, wie Strahlen- oder Chemotherapie, erhöhen [214].

Limitationen der Studie

Auch wenn diese Studie wertvolle Erkenntnisse zur Bedeutung von SOX2 und NANOG beim rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinom liefert, gibt es einige Einschränkungen, die berücksichtigt werden sollten. Ein wichtiger Punkt ist, dass die Daten nur aus einer einzigen Klinik stammen und daher multizentrische Daten nicht repräsentieren. Um sicherzustellen, dass die Erkenntnisse wirklich allgemeingültig sind, wären größere Studien an mehreren Zentren mit einer vielfältigeren Patientengruppe notwendig.

Ein weiterer Punkt ist, dass die Studie zwar einen Zusammenhang zwischen einer höheren SOX2-Expression und einer besseren Überlebensrate zeigt, aber nicht erklärt, warum das so ist. Es bleibt unklar, wie genau SOX2 das Tumorverhalten beeinflusst oder wie es sich auf die Reaktion auf Behandlungen auswirkt. Zukünftige Forschung sollte daher Laborexperimente mit Zellkulturen und Tiermodellen einbeziehen, um die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen.

Außerdem wurde die SOX2- und NANOG-Expression ausschließlich durch immunhistochemische Färbungen untersucht. Moderne molekulare Methoden wie RNA-Sequenzierung oder Genexpressionsanalysen wurden nicht genutzt, könnten aber dabei unterstützen, die biologischen Zusammenhänge noch besser zu verstehen. Ein weiterer Punkt ist, dass die Studie nicht zwischen frühen und späten Rezidiven unterscheidet – dabei könnten diese unterschiedlichen Ursachen haben. Eine genauere Betrachtung des Zeitpunkts des

Wiederauftretens sowie eine längere Nachbeobachtung der Patienten könnten helfen, Muster im Krankheitsverlauf besser zu erkennen und die Prognose genauer einzuschätzen.

Mithilfe einer datenbasierten Methode und einer Optimierung basierend auf Überlebensdaten wurde der H-Score-Schwellenwert für SOX2 in unseren Proben festgelegt. Durch diesen Grenzwert konnte eine prognostische Einteilung der Patienten vorgenommen werden, auch wenn er eventuell nicht allgemein auf andere Gruppen übertragbar ist. Es ist notwendig, die prognostische Bedeutung der SOX2-Expression durch Validierung in verschiedenen Gruppen zu bestätigen, da unterschiedliche Datensätze unterschiedliche Verteilungen aufweisen können.

Die Mehrheit der oralen Plattenepithelkarzinome zeigt eine reduzierte SOX2-Expression (mittlerer H-Score ~ 14), was die Notwendigkeit betont, Cutoff-Werte in der Biomarkerforschung kontextabhängig festzulegen. Dasselbe gilt auch für NANOG. Aktuell existiert keine einheitliche Vereinbarung über die idealen H-Score-Schwellenwerte für SOX2 und NANOG bei rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen. Die Festlegung des Cutoff-Werts anhand der Überlebensanalyse sichert die statistische Gültigkeit, berücksichtigt jedoch nicht zwangsläufig biologische Grenzwerte von praktischer Bedeutung. Künftige Forschungsprojekte sollten den Fokus auf die Standardisierung von Cutoff-Definitionen mithilfe von Daten aus verschiedenen Zentren legen.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht die prognostische Bedeutung der immunhistochemischen Expression der Transkriptionsfaktoren SOX2 und NANOG bei Patienten mit einem rezidivierenden Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Rezidivierende Tumoren stellen eine erhebliche klinische Herausforderung dar, da sie häufig mit einer ungünstigen Prognose und begrenzten therapeutischen Optionen einhergehen.

Ziel dieser Studie war es, die Expressionsmuster von SOX2 und NANOG sowohl im primären als auch im rezidivierenden Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle zu analysieren – mit besonderem Fokus auf den Einfluss adjuvanter Therapien auf deren Expression. Zudem wurde die prognostische Relevanz dieser Marker im Rezidivtumor im Hinblick auf das krankheitsfreie Überleben nach Rezidiv (prDFS) und das Gesamtüberleben nach Rezidiv (prOS) innerhalb einer klar definierten, prospektiv erhobenen Einzelzentrums-Kohorte untersucht. Ziel war es, die Risikostratifizierung zu verbessern und potenzielle Grundlagen für individualisierte Therapieansätze bei Patienten mit rezidivierendem oralen Plattenepithelkarzinom der zu schaffen.

Die Analyse ergab, dass eine hohe SOX2-Expression signifikant mit einem verlängerten prDFS und prOS assoziiert war. Patienten mit hoher SOX2-Expression zeigten eine deutlich günstigere Prognose. Eine erhöhte NANOG-Expression hingegen war nicht mit einer signifikanten Veränderung der Überlebensdaten verbunden. In der multivariaten Regressionsanalyse bestätigte sich eine hohe SOX2-Expression zudem als unabhängiger prognostischer Faktor.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SOX2 ein relevanter Marker zur prognostischen Einschätzung bei rezidivierenden Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle sein könnte. Die Integration von SOX2 in zukünftige diagnostische Algorithmen könnte dazu beitragen, Hochrisikopatienten frühzeitig zu identifizieren und individualisierte Nachsorge- oder Therapiestrategien zu entwickeln. Darüber hinaus unterstreichen die Daten die biologische Eigenständigkeit von Rezidiven im Vergleich zu Primärtumoren und liefern wertvolle Impulse für die zukünftige Forschung im Bereich der personalisierten Onkologie.

6. Literaturverzeichnis

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71 (2021) 209-249.
- [2] C.R. Leemans, P.J.F. Snijders, and R.H. Brakenhoff, The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* 18 (2018) 269-282.
- [3] J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D.M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor, and F. Bray, Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer* 144 (2019) 1941-1953.
- [4] D.E. Johnson, B. Burtneß, C.R. Leemans, V.W.Y. Lui, J.E. Bauman, and J.R. Grandis, Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 6 (2020) 92.
- [5] F. Bray, M. Laversanne, H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, I. Soerjomataram, and A. Jemal, Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 74 (2024) 229-263.
- [6] P.H. Montero, and S.G. Patel, Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am* 24 (2015) 491-508.
- [7] S. Warnakulasuriya, Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 45 (2009) 309-316.
- [8] RKI and GEKID, Krebs in Deutschland 2011/2012, Robert Koch-Institut, Berlin, 2015.
- [9] P.C. Gupta, P.R. Murti, R.B. Bhonsle, F.S. Mehta, and J.J. Pindborg, Effect of cessation of tobacco use on the incidence of oral mucosal lesions in a 10-yr follow-up study of 12,212 users. *Oral Dis* 1 (1995) 54-8.
- [10] B. Secretan, K. Straif, R. Baan, Y. Grosse, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet, and V. Coglianò, A review of human carcinogens 2014; Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *The Lancet Oncology* 10 (2009) 1033-1034.
- [11] K.A. Warnakulasuriya, N.W. Johnson, K.M. Linklater, and J. Bell, Cancer of mouth, pharynx and nasopharynx in Asian and Chinese immigrants resident in Thames regions. *Oral Oncol* 35 (1999) 471-5.
- [12] J. Xue, S. Yang, and S. Seng, Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. *Cancers (Basel)* 6 (2014) 1138-56.
- [13] C. Scully, J.K. Field, and H. Tanzawa, Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 36 (2000) 311-27.
- [14] R.P. Dikshit, and S. Kanhere, Tobacco habits and risk of lung, oropharyngeal and oral cavity cancer: a population-based case-control study in Bhopal, India. *Int J Epidemiol* 29 (2000) 609-14.
- [15] G. Di Credico, J. Polesel, L. Dal Maso, F. Pauli, N. Torelli, D. Luce, L. Radoi, K. Matsuo, D. Serraino, P. Brennan, I. Holcatova, W. Ahrens, P. Lagiou, C. Canova, L. Richiardi, C.M. Healy, K. Kjaerheim, D.I. Conway, G.J. Macfarlane, P. Thomson, A. Agudo, A. Znaor, S. Franceschi, R. Herrero, T.N. Toporcov, R.A. Moyses, J. Muscat, E. Negri, M. Vilensky, L. Fernandez, M.P. Curado, A. Menezes, A.W. Daudt, R. Koifman, V. Wunsch-Filho, A.F. Olshan, J.P. Zevallos, E.M. Sturgis, G. Li, F. Levi, Z.F. Zhang, H. Morgenstern, E. Smith, P. Lazarus, C. La Vecchia, W. Garavello, C. Chen, S.M. Schwartz, T. Zheng, T.L. Vaughan, K. Kelsey, M. McClean, S. Benhamou, R.B. Hayes, M.P. Purdue, M. Gillison, S. Schantz, G.P. Yu, S.C. Chuang, P. Boffetta, M. Hashibe, A.L. Yuan-Chin, and V. Edefonti, Alcohol drinking and head and neck cancer risk: the joint effect of intensity and duration. *Br J Cancer* 123 (2020) 1456-1463.

- [16] Z. Khan, and P.S. Bisen, Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancers: special reference to oral cancer. *Biochim Biophys Acta* 1836 (2013) 123-45.
- [17] L. Feng, and L. Wang, Effects of alcohol on the morphological and structural changes in oral mucosa. *Pak J Med Sci* 29 (2013) 1046-9.
- [18] R.B. Hayes, J. Ahn, X. Fan, B.A. Peters, Y. Ma, L. Yang, I. Agalliu, R.D. Burk, I. Ganly, M.P. Purdue, N.D. Freedman, S.M. Gapstur, and Z. Pei, Association of Oral Microbiome With Risk for Incident Head and Neck Squamous Cell Cancer. *JAMA Oncol* 4 (2018) 358-365.
- [19] L. Kim, T. King, and M. Agulnik, Head and neck cancer: changing epidemiology and public health implications. *Oncology* 24 (2010) 915.
- [20] V. Jayaprakash, M. Reid, E. Hatton, M. Merzianu, N. Rigual, J. Marshall, S. Gill, J. Frustino, G. Wilding, T. Loree, S. Popat, and M. Sullivan, Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis, 1985-2010. *Oral Oncol* 47 (2011) 1048-54.
- [21] A.K. Chaturvedi, E.A. Engels, W.F. Anderson, and M.L. Gillison, Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 26 (2008) 612-9.
- [22] E. Majchrzak, B. Szybiak, A. Wegner, P. Pienkowski, J. Pazdrowski, L. Luczewski, M. Sowka, P. Golusinski, J. Malicki, and W. Golusinski, Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiol Oncol* 48 (2014) 1-10.
- [23] A.R. Kreimer, G.M. Clifford, P. Boyle, and S. Franceschi, Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14 (2005) 467-75.
- [24] G. D'Souza, A.R. Kreimer, R. Viscidi, M. Pawlita, C. Fakhry, W.M. Koch, W.H. Westra, and M.L. Gillison, Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356 (2007) 1944-56.
- [25] A. Näsman, P. Attner, L. Hammarstedt, J. Du, M. Eriksson, G. Giraud, S. Ahrlund-Richter, L. Marklund, M. Romanitan, D. Lindquist, T. Ramqvist, J. Lindholm, P. Sparén, W. Ye, H. Dahlstrand, E. Munck-Wikland, and T. Dalianis, Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer* 125 (2009) 362-6.
- [26] J. Hou, Y. Gu, W. Hou, S. Wu, Y. Lou, W. Yang, L. Zhu, Y. Hu, M. Sun, and H. Xue, P53 codon 72 polymorphism, human papillomavirus infection, and their interaction to oral carcinoma susceptibility. *BMC Genet* 16 (2015) 72.
- [27] G. Yardimci, Z. Kutlubay, B. Engin, and Y. Tuzun, Precancerous lesions of oral mucosa. *World J Clin Cases* 2 (2014) 866-72.
- [28] R.K. Ambasta, MOLECULAR SIGNALLING SAGA IN TUMOUR BIOLOGY. *Journal of Tumor* 3 (2015) 309-313.
- [29] X. Han, M. Klas, Y. Liu, M.S. Stack, and S. Ptasinska, DNA damage in oral cancer cells induced by nitrogen atmospheric pressure plasma jets, *APS Annual Gaseous Electronics Meeting Abstracts*, 2013, pp. LW3.004.
- [30] N. Rivlin, R. Brosh, M. Oren, and V. Rotter, Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer* 2 (2011) 466-74.
- [31] D.L. Crowe, J.G. Hacia, C.L. Hsieh, U.K. Sinha, and H. Rice, Molecular pathology of head and neck cancer. *Histol Histopathol* 17 (2002) 909-14.
- [32] S.C. Reshmi, and S.M. Gollin, Chromosomal instability in oral cancer cells. *J Dent Res* 84 (2005) 107-17.
- [33] J.A. Gasche, and A. Goel, Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol* 8 (2012) 1407-25.

- [34] R. Sankaranarayanan, L. Fernandez Garrote, J. Lence Anta, P. Pisani, and A. Rodriguez Salva, Visual inspection in oral cancer screening in Cuba: a case-control study. *Oral Oncol* 38 (2002) 131-6.
- [35] D.C. Shugars, and L.L. Patton, Detecting, diagnosing, and preventing oral cancer. *Nurse Pract* 22 (1997) 105, 109-10, 113-5 passim.
- [36] A.D. Rapisdi, P. Gullane, J.D. Langdon, J.L. Lefebvre, C. Scully, and J.P. Shah, Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer. *Oral Oncol* 45 (2009) 299-300.
- [37] C. Scully, D. Malamos, B.G. Levers, S.R. Porter, and S.S. Prime, Sources and patterns of referrals of oral cancer: role of general practitioners. *Br Med J (Clin Res Ed)* 293 (1986) 599-601.
- [38] A. Milian, J.V. Bagan, and F. Vera, Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a follow up study of 85 cases and analysis of prognostic variables. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 36 (1993) 29-35.
- [39] A. Jainkittivong, S. Swasdison, M. Thangpitsityotin, and R.P. Langlais, Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathological study of 342 Thai cases. *J Contemp Dent Pract* 10 (2009) E033-40.
- [40] N.H. Al-Rawi, and N.G. Talabani, Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a case series analysis of clinical presentation and histological grading of 1,425 cases from Iraq. *Clin Oral Investig* 12 (2008) 15-8.
- [41] J. Bagan, G. Sarrion, and Y. Jimenez, Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol* 46 (2010) 414-7.
- [42] A. Mashberg, F. Merletti, P. Boffetta, S. Gandolfo, F. Ozzello, F. Fracchia, and B. Terracini, Appearance, site of occurrence, and physical and clinical characteristics of oral carcinoma in Torino, Italy. *Cancer* 63 (1989) 2522-7.
- [43] C. Scully, and J. Bagan, Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis* 15 (2009) 388-99.
- [44] B.W. Neville, and T.A. Day, Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 52 (2002) 195-215.
- [45] A.C. Ribeiro, A.R. Silva, L.E. Simonato, L.M. Salzedas, M.L. Sundefeld, and A.M. Soubhia, Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. *Br J Oral Maxillofac Surg* 47 (2009) 95-8.
- [46] Y. Mallet, N. Avalos, A.M. Le Ridant, P. Gangloff, S. Moriniere, J.P. Rame, G. Poissonnet, M. Makeieff, A. Cosmidis, E. Babin, B. Barry, and C. Fournier, Head and neck cancer in young people: a series of 52 SCCs of the oral tongue in patients aged 35 years or less. *Acta Otolaryngol* 129 (2009) 1503-8.
- [47] S3-Leitlinienprogramm Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. AWMF-Registernummer: 007/100OL (2021).
- [48] J.D. Brierley, M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*, John Wiley & Sons, 2017.
- [49] D.B. Nandini, R.S. Rao, J. Hosmani, S. Khan, S. Patil, and K.H. Awan, Novel therapies in the management of oral cancer: An update. *Dis Mon* 66 (2020) 101036.
- [50] T. Wong, and D. Wiesenfeld, Oral Cancer. *Australian Dental Journal* 63 (2018) S91-S99.
- [51] T. Helliwell, and J. Woolgar, Standards and minimum datasets for reporting common cancers. *Minimum Dataset for Head and Neck Histopathology Reports* (1998).
- [52] J. Kijowska, J. Grzegorzczak, K. Gliwa, A. Jędras, and M. Sitarz, Epidemiology, Diagnostics, and Therapy of Oral Cancer—Update Review. *Cancers* 16 (2024) 3156.
- [53] S.A. Abbas, M. Ikram, M.U. Tariq, A. Raheem, and J. Saeed, Accuracy of frozen sections in oral cancer resections, an experience of a tertiary care hospital. *Journal of the Pakistan Medical Association* 67 (2017) 806-809.

- [54] A. Alvi, and J.T. Johnson, Extracapsular spread in the clinically negative neck (N0): implications and outcome. *Otolaryngol Head Neck Surg* 114 (1996) 65-70.
- [55] A.K. D'Cruz, R. Vaish, N. Kapre, M. Dandekar, S. Gupta, R. Hawaldar, J.P. Agarwal, G. Pantvaidya, D. Chaukar, A. Deshmukh, S. Kane, S. Arya, S. Ghosh-Laskar, P. Chaturvedi, P. Pai, S. Nair, D. Nair, and R. Badwe, Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer. *New England Journal of Medicine* 373 (2015) 521-529.
- [56] S.R. Quinlan-Davidson, A.S.R. Mohamed, J.N. Myers, G.B. Gunn, F.M. Johnson, H. Skinner, B.M. Beadle, A.M. Gillenwater, J. Phan, S.J. Frank, W.N. William, A.J. Wong, S.Y. Lai, C.D. Fuller, W.H. Morrison, D.I. Rosenthal, and A.S. Garden, Outcomes of oral cavity cancer patients treated with surgery followed by postoperative intensity modulated radiation therapy. *Oral Oncology* 72 (2017) 90-97.
- [57] S.H. Huang, E. Hahn, S.I. Chiosea, Z.-Y. Xu, J.-S. Li, L. Shen, and B. O'Sullivan, The role of adjuvant (chemo-)radiotherapy in oral cancers in the contemporary era. *Oral Oncology* 102 (2020) 104563.
- [58] S.P. Mohan, M.K. Bhaskaran, A.L. George, A. Thirutheri, M. Somasundaran, and A. Pavithran, Immunotherapy in Oral Cancer. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 11 (2019) S107-S111.
- [59] Z. Mei, J. Huang, B. Qiao, and A.K. Lam, Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci* 12 (2020) 16.
- [60] R.L. Ferris, L. Licitra, J. Fayette, C. Even, G. Blumenschein, Jr., K.J. Harrington, J. Guigay, E.E. Vokes, N.F. Saba, R. Haddad, S. Ramkumar, J. Russell, P. Brossart, M. Tahara, A.D. Colevas, F. Concha-Benavente, M. Lynch, L. Li, and M.L. Gillison, Nivolumab in Patients with Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Efficacy and Safety in CheckMate 141 by Prior Cetuximab Use. *Clin Cancer Res* 25 (2019) 5221-5230.
- [61] B. Burtness, K.J. Harrington, R. Greil, D. Soulières, M. Tahara, G. De Castro, Jr., A. Psyrrri, N. Baste Rotllan, P.C. Neupane, Å. Bratland, T. Fuereder, B.G.M. Hughes, R. Mesia, N. Ngamphaiboon, T. Rordorf, W.Z. Wan Ishak, A. Roy, J. Cheng, F. Jin, and D. Rischin, KEYNOTE-048: Phase III study of first-line pembrolizumab (P) for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC). *Annals of Oncology* 29 (2018) viii729.
- [62] M.A. Couey, R.S. Leidner, S.W. Young, and R.B. Bell, Immunotherapy in Oral Cancer: A Fourth Dimension of Cancer Treatment. in: D. Kademani, (Ed.), *Improving Outcomes in Oral Cancer: A Clinical and Translational Update*, Springer International Publishing, Cham, 2020, pp. 129-154.
- [63] J.B. Vermorken, R. Mesia, F. Rivera, E. Remenar, A. Kawecki, S. Rottey, J. Erfan, D. Zabolotnyy, H.R. Kienzer, D. Cupissol, F. Peyrade, M. Benasso, I. Vynnychenko, D. De Raucourt, C. Bokemeyer, A. Schueler, N. Amellal, and R. Hitt, Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359 (2008) 1116-27.
- [64] R.L. Ferris, G. Blumenschein, Jr., J. Fayette, J. Guigay, A.D. Colevas, L. Licitra, K. Harrington, S. Kasper, E.E. Vokes, C. Even, F. Worden, N.F. Saba, L.C. Iglesias Docampo, R. Haddad, T. Rordorf, N. Kiyota, M. Tahara, M. Monga, M. Lynch, W.J. Geese, J. Kopit, J.W. Shaw, and M.L. Gillison, Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 375 (2016) 1856-1867.
- [65] S. Sood, P. Mehta, S. Sharma, and A. Badola, Factors associated with recurrence in oral cavity squamous cell carcinoma: A real-world experience from an Indian comprehensive cancer center, *American Society of Clinical Oncology*, 2022.
- [66] O. Davaatsend, M. Altannamar, M. Ganbat, and U. Jagdagsuren, Factors associated with recurrence in patients with oral cancer in Mongolia. *BMC Cancer* 24 (2024) 356.

- [67] B. Wang, S. Zhang, K. Yue, and X.-D. Wang, The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases. *Chinese journal of cancer* 32 (2013) 614.
- [68] W. Wang, S. Han, Z. Yao, X. Li, P. Huang, M. Zhang, Y. Chen, and J. He, A study of epidemiologic and recurrence factors of oral cancer. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 70 (2012) 2205-2210.
- [69] N.H. Hassan, B. Ayub, T.A. Qureshi, S.A. Shaikh, M. Kazi, R. Usman, and U.S. Haroon, Risk factors associated with disease recurrence in patients with T4 staged squamous cell carcinoma of the oral cavity treated with surgery and postoperative radiotherapy. *J Pak Med Assoc* 72 (2022) 2399-403.
- [70] K.R. Jones, R.D. Lodge-Rigal, R.L. Reddick, G.E. Tudor, and W.W. Shockley, Prognostic factors in the recurrence of stage I and II squamous cell cancer of the oral cavity. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 118 (1992) 483-485.
- [71] A.R. Noble, J.F. Greskovich, J. Han, C.A. Reddy, T.I. Nwizu, M.F. Khan, J. Scharpf, D.J. Adelstein, B.B. Burkey, and S.A. Koyfman, Risk factors associated with disease recurrence in patients with stage III/IV squamous cell carcinoma of the oral cavity treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Anticancer Research* 36 (2016) 785-792.
- [72] S. Krishnamurthy, Z. Dong, D. Vodopyanov, A. Imai, J.I. Helman, M.E. Prince, M.S. Wicha, and J.E. Nör, Endothelial Cell-Initiated Signaling Promotes the Survival and Self-Renewal of Cancer Stem Cells. *Cancer Research* 70 (2010) 9969-9978.
- [73] A. Faber, C. Barth, K. Hörmann, S. Kassner, J.D. Schultz, U. Sommer, J. Stern-Straeter, C. Thorn, and U.R. Goessler, CD44 as a stem cell marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology reports* 26 (2011) 321-326.
- [74] C.M. Sterz, C. Kulle, B. Dakic, G. Makarova, M.C. Böttcher, M. Bette, J.A. Werner, and R. Mandic, A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral Oncology* 46 (2010) 116-122.
- [75] V. Samanna, T. Ma, T.W. Mak, M. Rogers, and M.A. Chellaiah, Actin polymerization modulates CD44 surface expression, MMP-9 activation, and osteoclast function. *Journal of Cellular Physiology* 213 (2007) 710-720.
- [76] M.M. Nijkamp, P.N. Span, I.J. Hoogsteen, A.J. van der Kogel, J.H. Kaanders, and J. Bussink, Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiotherapy and Oncology* 99 (2011) 344-348.
- [77] B. Peltanova, M. Raudenska, and M. Masarik, Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Molecular cancer* 18 (2019) 63.
- [78] M.-H. Yang, M.-Z. Wu, S.-H. Chiou, P.-M. Chen, S.-Y. Chang, C.-J. Liu, S.-C. Teng, and K.-J. Wu, Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nature cell biology* 10 (2008) 295-305.
- [79] Z. Zhang, M. Sant’Ana Filho, and J.E. Noer, The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral oncology* 48 (2012) 1-9.
- [80] J.E. Swartz, A.J. Pothan, P.M.W. van Kempen, I. Stegeman, F.K. Formsma, E.M.V. Cann, S.M. Willems, and W. Grolman, Poor prognosis in human papillomavirus–positive oropharyngeal squamous cell carcinomas that overexpress hypoxia inducible factor-1 α . *Head & neck* 38 (2016) 1338-1346.
- [81] S.V. Puram, I. Tirosh, A.S. Parikh, A.P. Patel, K. Yizhak, S. Gillespie, C. Rodman, C.L. Luo, E.A. Mroz, and K.S. Emerick, Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell* 171 (2017) 1611-1624. e24.
- [82] E.D. Williams, D. Gao, A. Redfern, and E.W. Thompson, Controversies around epithelial–mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nature Reviews Cancer* 19 (2019) 716-732.

- [83] D.P. Slaughter, H.W. Southwick, and W. Smejkal, "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6 (1953) 963-968.
- [84] D. Young, C.C. Xiao, B. Murphy, M. Moore, C. Fakhry, and T.A. Day, Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). *Oral Oncol* 51 (2015) 727-30.
- [85] N. Stransky, A.M. Egloff, A.D. Tward, A.D. Kostic, K. Cibulskis, A. Sivachenko, G.V. Kryukov, M.S. Lawrence, C. Sougnez, A. McKenna, E. Shefler, A.H. Ramos, P. Stojanov, S.L. Carter, D. Voet, M.L. Cortés, D. Auclair, M.F. Berger, G. Saksena, C. Guiducci, R.C. Onofrio, M. Parkin, M. Romkes, J.L. Weissfeld, R.R. Seethala, L. Wang, C. Rangel-Escareño, J.C. Fernandez-Lopez, A. Hidalgo-Miranda, J. Melendez-Zajgla, W. Winckler, K. Ardlie, S.B. Gabriel, M. Meyerson, E.S. Lander, G. Getz, T.R. Golub, L.A. Garraway, and J.R. Grandis, The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 333 (2011) 1157-60.
- [86] S. Kalyankrishna, and J.R. Grandis, Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 24 (2006) 2666-72.
- [87] S. Warren, Multiple primary malignant tumors. A survey of the literature and a statistical study. *Am J cancer* 16 (1932) 1358-1414.
- [88] W.K. Hong, S.M. Lippman, L.M. Itri, D.D. Karp, J.S. Lee, R.M. Byers, S.P. Schantz, A.M. Kramer, R. Lotan, L.J. Peters, I.W. Dimery, B.W. Brown, and H. Goepfert, Prevention of Second Primary Tumors with Isotretinoin in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine* 323 (1990) 795-801.
- [89] B.J. Braakhuis, M.P. Tabor, C.R. Leemans, I. van der Waal, G.B. Snow, and R.H. Brakenhoff, Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 24 (2002) 198-206.
- [90] B.J.M. Braakhuis, R.H. Brakenhoff, and C.R. Leemans, Second Field Tumors: A New Opportunity for Cancer Prevention? *The Oncologist* 10 (2005) 493-500.
- [91] V.F. Gutiérrez, C.Á. Marcos, J.L. Llorente, M.A. Guervós, F.D. Iglesias, L.A. Tamargo, and M. Hermsen, Genetic profile of second primary tumors and recurrences in head and neck squamous cell carcinomas. *Head & Neck* 34 (2012) 830-839.
- [92] L. Montebugnoli, E. Leonardi, L. Morandi, A. Farnedi, D.B. Gissi, C. Marchetti, A. Tarsitano, T. Balbi, L. Gentile, R. Cocchi, and M.P. Foschini, Genetic relationship between multiple squamous cell carcinomas arising in the oral cavity. *Head & Neck* 36 (2014) 94-100.
- [93] M. Partridge, S.R. Li, S. Pateromichelakis, R. Francis, E. Phillips, X.H. Huang, F. Tesfa-Selase, and J.D. Langdon, Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 2718-25.
- [94] M.P. Tabor, R.H. Brakenhoff, H.J. Ruijter-Schippers, J.E. van der Wal, G.B. Snow, C.R. Leemans, and B.J.M. Braakhuis, Multiple Head and Neck Tumors Frequently Originate from a Single Preneoplastic Lesion. *The American Journal of Pathology* 161 (2002) 1051-1060.
- [95] P.K. Ha, and J.A. Califano, The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Crit Rev Oral Biol Med* 14 (2003) 363-9.
- [96] J. Califano, P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi, R. Corio, D. Lee, B. Greenberg, W. Koch, and D. Sidransky, Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56 (1996) 2488-92.
- [97] M.P. Tabor, R.H. Brakenhoff, V.M. van Houten, J.A. Kummer, M.H. Snel, P.J. Snijders, G.B. Snow, C.R. Leemans, and B.J. Braakhuis, Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 1523-32.
- [98] M. Brandwein-Gensler, M.S. Teixeira, C.M. Lewis, B. Lee, L. Rolnitzky, J.J. Hille, E. Genden, M.L. Urken, and B.Y. Wang, Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol* 29 (2005) 167-78.

- [99] A.C. de Carvalho, L.P. Kowalski, A.H.J.F.M. Campos, F.A. Soares, A.L. Carvalho, and A.L. Vettore, Clinical significance of molecular alterations in histologically negative surgical margins of head and neck cancer patients. *Oral Oncology* 48 (2012) 240-248.
- [100] M.S. Lawrence, P. Stojanov, C.H. Mermel, J.T. Robinson, L.A. Garraway, T.R. Golub, M. Meyerson, S.B. Gabriel, E.S. Lander, and G. Getz, Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505 (2014) 495-501.
- [101] Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517 (2015) 576-82.
- [102] N. Agrawal, M.J. Frederick, C.R. Pickering, C. Bettegowda, K. Chang, R.J. Li, C. Fakhry, T.-X. Xie, J. Zhang, J. Wang, N. Zhang, A.K. El-Naggar, S.A. Jasser, J.N. Weinstein, L. Treviño, J.A. Drummond, D.M. Muzny, Y. Wu, L.D. Wood, R.H. Hruban, W.H. Westra, W.M. Koch, J.A. Califano, R.A. Gibbs, D. Sidransky, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, N. Papadopoulos, D.A. Wheeler, K.W. Kinzler, and J.N. Myers, Exome Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Inactivating Mutations in *NOTCH1*. *Science* 333 (2011) 1154-1157.
- [103] M.S. Lawrence, P. Stojanov, P. Polak, G.V. Kryukov, K. Cibulskis, A. Sivachenko, S.L. Carter, C. Stewart, C.H. Mermel, S.A. Roberts, A. Kiezun, P.S. Hammerman, A. McKenna, Y. Drier, L. Zou, A.H. Ramos, T.J. Pugh, N. Stransky, E. Helman, J. Kim, C. Sougnez, L. Ambrogio, E. Nickerson, E. Shefler, M.L. Cortés, D. Auclair, G. Saksena, D. Voet, M. Noble, D. DiCara, P. Lin, L. Lichtenstein, D.I. Heiman, T. Fennell, M. Imielinski, B. Hernandez, E. Hodis, S. Baca, A.M. Dulak, J. Lohr, D.-A. Landau, C.J. Wu, J. Melendez-Zajgla, A. Hidalgo-Miranda, A. Koren, S.A. McCarroll, J. Mora, R.S. Lee, B. Crompton, R. Onofrio, M. Parkin, W. Winckler, K. Ardlie, S.B. Gabriel, C.W.M. Roberts, J.A. Biegel, K. Stegmaier, A.J. Bass, L.A. Garraway, M. Meyerson, T.R. Golub, D.A. Gordenin, S. Sunyaev, E.S. Lander, and G. Getz, Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499 (2013) 214-218.
- [104] R. González-García, L. Naval-Gías, L. Román-Romero, J. Sastre-Pérez, and F.J. Rodríguez-Campo, Local recurrences and second primary tumors from squamous cell carcinoma of the oral cavity: A retrospective analytic study of 500 patients. *Head & Neck* 31 (2009) 1168-1180.
- [105] E. Rennemo, U. Zätterström, and M. Boysen, Outcome of local failures after oral cancer – recurrence vs. second primary. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 39 (2010) 657-661.
- [106] P.P. Reis, L. Waldron, B. Perez-Ordóñez, M. Pintilie, N.N. Galloni, Y. Xuan, N.K. Cervigne, G.C. Warner, A.A. Makitie, C. Simpson, D. Goldstein, D. Brown, R. Gilbert, P. Gullane, J. Irish, I. Jurisica, and S. Kamel-Reid, A gene signature in histologically normal surgical margins is predictive of oral carcinoma recurrence. *BMC Cancer* 11 (2011) 437.
- [107] C.F. Poh, L. Zhang, D.W. Anderson, J.S. Durham, P.M. Williams, R.W. Priddy, K.W. Berean, S. Ng, O.L. Tseng, C. MacAulay, and M.P. Rosin, Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. *Clin Cancer Res* 12 (2006) 6716-22.
- [108] S. Blatt, M. Krüger, K. Sagheb, M. Barth, P.W. Kämmerer, B. Al-Nawas, and K. Sagheb, Tumor Recurrence and Follow-Up Intervals in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Med* 11 (2022).
- [109] I. Ostrovnyaya, A.B. Olshen, V.E. Seshan, I. Orlow, D.G. Albertson, and C.B. Begg, A metastasis or a second independent cancer? Evaluating the clonal origin of tumors using array copy number data. *Statistics in Medicine* 29 (2010) 1608-1621.
- [110] M. Thomson, S.J. Liu, L.-N. Zou, Z. Smith, A. Meissner, and S. Ramanathan, Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* 145 (2011) 875-889.
- [111] L.A. Boyer, T.I. Lee, M.F. Cole, S.E. Johnstone, S.S. Levine, J.P. Zucker, M.G. Guenther, R.M. Kumar, H.L. Murray, R.G. Jenner, D.K. Gifford, D.A. Melton, R. Jaenisch, and R.A. Young, Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122 (2005) 947-56.
- [112] M. Rumman, J. Dhawan, and M. Kassem, Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration. *Stem Cells* 33 (2015) 2903-12.

- [113] M. Amit, M.K. Carpenter, M.S. Inokuma, C.P. Chiu, C.P. Harris, M.A. Waknitz, J. Itskovitz-Eldor, and J.A. Thomson, Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227 (2000) 271-8.
- [114] Y. Guo, R. Costa, H. Ramsey, T. Starnes, G. Vance, K. Robertson, M. Kelley, R. Reinbold, H. Scholer, and R. Hromas, The embryonic stem cell transcription factors Oct-4 and FoxD3 interact to regulate endodermal-specific promoter expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002) 3663-3667.
- [115] K. Mitsui, Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, and S. Yamanaka, The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113 (2003) 631-642.
- [116] T. Seymour, A.-J. Twigger, and F. Kakulas, Pluripotency Genes and Their Functions in the Normal and Aberrant Breast and Brain. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (2015) 27288-27301.
- [117] I. Trivaii, T. Stübig, B. Niebuhr, K. Hussein, A. Tsiftoglou, B. Fehse, C. Stocking, and N. Kröger, CD133 marks a stem cell population that drives human primary myelofibrosis. *haematologica* 100 (2015) 768.
- [118] Y. Bu, and D. Cao, The origin of cancer stem cells. *FBS* 4 (2012) 819-830.
- [119] G. Sun, M. Fujii, A. Sonoda, Y. Tokumaru, T. Matsunaga, and N. Habu, Identification of stem-like cells in head and neck cancer cell lines. *Anticancer Res* 30 (2010) 2005-10.
- [120] S.-H. Chiou, C.-C. Yu, C.-Y. Huang, S.-C. Lin, C.-J. Liu, T.-H. Tsai, S.-H. Chou, C.-S. Chien, H.-H. Ku, and J.-F. Lo, Positive Correlations of Oct-4 and Nanog in Oral Cancer Stem-Like Cells and High-Grade Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 14 (2008) 4085-4095.
- [121] Z. Xi, H. Guang-Rong, and H. Pin, Over-Expression of Oct4 in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Molecules and Cells* 32 (2011) 39-46.
- [122] F. Bhajjee, D.J. Pepper, K.T. Pitman, and D. Bell, Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: A review of current knowledge and future applications. *Head & Neck* 34 (2012) 894-899.
- [123] A. Alt-Holland, Y. Shamis, K.N. Riley, T.M. DesRochers, N.E. Fusenig, I.M. Herman, and J.A. Garlick, E-Cadherin Suppression Directs Cytoskeletal Rearrangement and Intraepithelial Tumor Cell Migration in 3D Human Skin Equivalents. *Journal of Investigative Dermatology* 128 (2008) 2498-2507.
- [124] T. Masui, I. Ota, J.-I. Yook, S. Mikami, K. Yane, T. Yamanaka, and H. Hosoi, Snail-induced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. *Int J Oncol* 44 (2014) 693-699.
- [125] L.-L. Tsai, F.-W. Hu, S.-S. Lee, C.-H. Yu, C.-C. Yu, and Y.-C. Chang, Oct4 Mediates Tumor Initiating Properties in Oral Squamous Cell Carcinomas through the Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLOS ONE* 9 (2014) e87207.
- [126] M. Herreros-Villanueva, J.S. Zhang, A. Koenig, E.V. Abel, T.C. Smyrk, W.R. Bamlet, A.A.M. de Narvajias, T.S. Gomez, D.M. Simeone, L. Bujanda, and D.D. Billadeau, SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* 2 (2013) e61-e61.
- [127] S.M. Kumar, S. Liu, H. Lu, H. Zhang, P.J. Zhang, P.A. Gimotty, M. Guerra, W. Guo, and X. Xu, Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene* 31 (2012) 4898-4911.
- [128] R. Di Fiore, M. Marcatti, R. Drago-Ferrante, A. D'Anneo, M. Giuliano, D. Carlisi, A. De Blasio, F. Querques, L. Pastore, G. Tesoriere, and R. Vento, Mutant p53 gain of function can be at the root of dedifferentiation of human osteosarcoma MG63 cells into 3AB-OS cancer stem cells. *Bone* 60 (2014) 198-212.

- [129] J.-H. Moon, S. Kwon, E.K. Jun, A. Kim, K.Y. Whang, H. Kim, S. Oh, B.S. Yoon, and S. You, Nanog-induced dedifferentiation of p53-deficient mouse astrocytes into brain cancer stem-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412 (2011) 175-181.
- [130] Z.-T. Zhou, and W.-W. Jiang, Cancer stem cell model in oral squamous cell carcinoma. *Current Stem Cell Research & Therapy* 3 (2008) 17-20.
- [131] A. Biddle, X. Liang, L. Gammon, B. Fazil, L.J. Harper, H. Emich, D.E. Costea, and I.C. Mackenzie, Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res* 71 (2011) 5317-26.
- [132] C. Bianchini, A. Ciorba, S. Pelucchi, R. Piva, and A. Pastore, Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumori* 97 (2011) 137-41.
- [133] B. Qiao, B. He, J. Cai, and W. Yang, The expression profile of Oct4 and Sox2 in the carcinogenesis of oral mucosa. *Int J Clin Exp Pathol* 7 (2014) 28-37.
- [134] A. Suresh, M. Vannan, D. Kumaran, Z.H. Gümüs, P. Sivadas, E.E. Murugaian, V. Kekatpure, S. Iyer, K. Thangaraj, and M.A. Kuriakose, Resistance/response molecular signature for oral tongue squamous cell carcinoma. *Dis Markers* 32 (2012) 51-64.
- [135] E. Gallmeier, P.C. Hermann, M.T. Mueller, J.G. Machado, A. Ziesch, E.N. De Toni, A. Palagyi, C. Eisen, J.W. Ellwart, J. Rivera, B. Rubio-Viqueira, M. Hidalgo, F. Bunz, B. Göke, and C. Heeschen, Inhibition of ataxia telangiectasia- and Rad3-related function abrogates the in vitro and in vivo tumorigenicity of human colon cancer cells through depletion of the CD133(+) tumor-initiating cell fraction. *Stem Cells* 29 (2011) 418-29.
- [136] C.C. Yu, and Y.C. Chang, Enhancement of cancer stem-like and epithelial-mesenchymal transdifferentiation property in oral epithelial cells with long-term nicotine exposure: reversal by targeting SNAIL. *Toxicol Appl Pharmacol* 266 (2013) 459-69.
- [137] Y. Arima, N. Hayashi, H. Hayashi, M. Sasaki, K. Kai, E. Sugihara, E. Abe, A. Yoshida, S. Mikami, S. Nakamura, and H. Saya, Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer. *Int J Cancer* 130 (2012) 2568-79.
- [138] M. Simple, A. Suresh, D. Das, and M.A. Kuriakose, Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 51 (2015) 643-51.
- [139] O. Martínez-Iglesias, S. Garcia-Silva, S.P. Tenbaum, J. Regadera, F. Larcher, J.M. Paramio, B. Vennström, and A. Aranda, Thyroid hormone receptor beta1 acts as a potent suppressor of tumor invasiveness and metastasis. *Cancer Res* 69 (2009) 501-9.
- [140] R.A. Weinberg, The retinoblastoma gene and gene product. *Cancer Surv* 12 (1992) 43-57.
- [141] S. Godar, T.A. Ince, G.W. Bell, D. Feldser, J.L. Donaher, J. Bergh, A. Liu, K. Miu, R.S. Watnick, F. Reinhardt, S.S. McAllister, T. Jacks, and R.A. Weinberg, Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell* 134 (2008) 62-73.
- [142] M. Zhang, F. Behbod, R.L. Atkinson, M.D. Landis, F. Kittrell, D. Edwards, D. Medina, A. Tsimelzon, S. Hilsenbeck, J.E. Green, A.M. Michalowska, and J.M. Rosen, Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 68 (2008) 4674-82.
- [143] B.J. Braakhuis, M.P. Tabor, J.A. Kummer, C.R. Leemans, and R.H. Brakenhoff, A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 63 (2003) 1727-30.
- [144] R. Cabanillas, and J.L. Llorente, The Stem Cell Network model: clinical implications in cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266 (2009) 161-70.
- [145] I. Joseph, R. Tressler, E. Bassett, C. Harley, C.M. Buseman, P. Pattamatta, W.E. Wright, J.W. Shay, and N.F. Go, The telomerase inhibitor imetelstat depletes cancer stem cells in breast and pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 70 (2010) 9494-504.

- [146] J.W. Shay, and W.E. Wright, Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett* 584 (2010) 3819-25.
- [147] S.S. Baxi, L.C. Pinheiro, S.M. Patil, D.G. Pfister, K.C. Oeffinger, and E.B. Elkin, Causes of death in long-term survivors of head and neck cancer. *Cancer* 120 (2014) 1507-13.
- [148] E.M. Sturgis, and R.H. Miller, Second primary malignancies in the head and neck cancer patient. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104 (1995) 946-54.
- [149] X. León, M. Del Prado Venegas, C. Orús, K. Kolańczak, J. García, and M. Quer, Metachronous second primary tumours in the aerodigestive tract in patients with early stage head and neck squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 262 (2005) 905-9.
- [150] V. Snyder, T. Reed-Newman, L. Arnold, S. Thomas, and S. Anant, Cancer Stem Cell Metabolism and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Oncology* 8 (2018).
- [151] L. Züllig, M. Roessle, C. Weber, N. Graf, S.K. Haerle, W. Jochum, S.J. Stoeckli, H. Moch, and G.F. Huber, High sex determining region Y-box 2 expression is a negative predictor of occult lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur J Cancer* 49 (2013) 1915-22.
- [152] B.W. Kim, H. Cho, C.H. Choi, K. Ylaja, J.-Y. Chung, J.-H. Kim, and S.M. Hewitt, Clinical significance of OCT4 and SOX2 protein expression in cervical cancer. *BMC Cancer* 15 (2015) 1015.
- [153] S.H. Lee, S.Y. Oh, S.I. Do, H.J. Lee, H.J. Kang, Y.S. Rho, W.J. Bae, and Y.C. Lim, SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 111 (2014) 2122-30.
- [154] L.Y. Bourguignon, G. Wong, C. Earle, and L. Chen, Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J Biol Chem* 287 (2012) 32800-24.
- [155] J.C. de Vicente, T. Rodríguez-Santamarta, J.P. Rodrigo, E. Allonca, A. Vallina, A. Singhanía, P. Donate-Pérez del Molino, and J.M. García-Pedrero, The Emerging Role of NANOG as an Early Cancer Risk Biomarker in Patients with Oral Potentially Malignant Disorders. *Journal of Clinical Medicine* 8 (2019) 1376.
- [156] B. van Schaijik, P.F. Davis, A.C. Wickremesekera, S.T. Tan, and T. Itinteang, Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review. *Journal of Clinical Pathology* 71 (2018) 88.
- [157] S. Steen, D. Horn, C. Flechtenmacher, J. Hoffmann, K. Freier, O. Ristow, J. Hess, and J. Moratin, Expression analysis of SOX2 and SOX9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 47 (2025) 437-451.
- [158] S. Zhang, X. Xiong, and Y. Sun, Functional characterization of SOX2 as an anticancer target. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (2020) 135.
- [159] I.S. Mohiuddin, S.J. Wei, and M.H. Kang, Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866 (2020) 165432.
- [160] N. Ivanova, R. Dobrin, R. Lu, I. Kottenko, J. Levorse, C. DeCoste, X. Schafer, Y. Lun, and I.R. Lemischka, Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442 (2006) 533-8.
- [161] J. Wang, S. Rao, J. Chu, X. Shen, D.N. Levasseur, T.W. Theunissen, and S.H. Orkin, A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 444 (2006) 364-8.
- [162] N. Kokalj Vokač, B. Cizmarević, A. Zagorac, B. Zagradišnik, and B. Lanišnik, An evaluation of SOX2 and hTERT gene amplifications as screening markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Mol Cytogenet* 7 (2014) 5.
- [163] Z.H. Ren, C.P. Zhang, and T. Ji, Expression of SOX2 in oral squamous cell carcinoma and the association with lymph node metastasis (Review). *Oncol Lett* 11 (2016) 1973-1979.

- [164] T. Wilbertz, P. Wagner, K. Petersen, A.C. Stiedl, V.J. Scheble, S. Maier, M. Reischl, R. Mikut, N.K. Altorki, H. Moch, F. Fend, A. Staebler, A.J. Bass, M. Meyerson, M.A. Rubin, A. Soltermann, C. Lengerke, and S. Perner, SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol* 24 (2011) 944-53.
- [165] K.F. He, L. Zhang, C.F. Huang, S.R. Ma, Y.F. Wang, W.M. Wang, Z.L. Zhao, B. Liu, Y.F. Zhao, W.F. Zhang, and Z.J. Sun, CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int* 2014 (2014) 838632.
- [166] T. Hussenet, S. Dali, J. Exinger, B. Monga, B. Jost, D. Dembelé, N. Martinet, C. Thibault, J. Huelsken, E. Brambilla, and S. du Manoir, SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS One* 5 (2010) e8960.
- [167] M.L. Wang, S.H. Chiou, and C.W. Wu, Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. *Onco Targets Ther* 6 (2013) 1207-20.
- [168] T. Kashyap, N. Nath, P. Mishra, A. Jha, S. Nagini, and R. Mishra, Pluripotency transcription factor Nanog and its association with overall oral squamous cell carcinoma progression, cisplatin-resistance, invasion and stemness acquisition. *Head & Neck* 42 (2020) 3282-3294.
- [169] D.F. Chang, S.C. Tsai, X.C. Wang, P. Xia, D. Senadheera, and C. Lutzko, Molecular characterization of the human NANOG protein. *Stem Cells* 27 (2009) 812-21.
- [170] M. Watanabe, Y. Ohnishi, H. Inoue, M. Wato, A. Tanaka, K. Kakudo, and M. Nozaki, NANOG expression correlates with differentiation, metastasis and resistance to preoperative adjuvant therapy in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 7 (2014) 35-40.
- [171] L.-L. Tsai, C.-C. Yu, Y.-C. Chang, C.-H. Yu, and M.-Y. Chou, Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 40 (2011) 621-628.
- [172] C.C. Hwang, S. Nieh, C.H. Lai, C.S. Tsai, L.C. Chang, C.C. Hua, W.Y. Chi, H.P. Chien, C.W. Wang, S.C. Chan, T.Y. Hsieh, and J.R. Chen, A retrospective review of the prognostic value of ALDH-1, Bmi-1 and Nanog stem cell markers in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* 9 (2014) e105676.
- [173] H.-M. Kim, Y.-H. Kang, J.-H. Byun, S.-J. Jang, G.-J. Rho, J.-S. Lee, and B.-W. Park, Midkine and NANOG Have Similar Immunohistochemical Expression Patterns and Contribute Equally to an Adverse Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2017) 2339.
- [174] S. Patel, K. Shah, S. Mirza, K. Shah, and R. Rawal, Circulating tumor stem like cells in oral squamous cell carcinoma: An unresolved paradox. *Oral Oncol* 62 (2016) 139-146.
- [175] F. Baghai Naini, P. Aminishakib, A. Abdollahi, M. Hodjat, H. Mohammadpour, and N. Kardouni Khoozestani, Relative Expression of OCT4, SOX2 and NANOG in Oral Squamous Cell Carcinoma Versus Adjacent Non- Tumor Tissue. *Asian Pac J Cancer Prev* 20 (2019) 1649-1654.
- [176] D. Pedregal-Mallo, F. Hermida-Prado, R. Granda-Díaz, I. Montoro-Jiménez, E. Allonca, E. Pozo-Agundo, M. Álvarez-Fernández, C. Álvarez-Marcos, J.M. García-Pedrero, and J.P. Rodrigo, Prognostic Significance of the Pluripotency Factors NANOG, SOX2, and OCT4 in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancers* 12 (2020) 1794.
- [177] T.-Y. Fu, I.-C. Hsieh, J.-T. Cheng, M.-H. Tsai, Y.-Y. Hou, J.-H. Lee, H.-H. Liou, S.-F. Huang, H.-C. Chen, L.-M. Yen, H.-H. Tseng, and L.-P. Ger, Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 45 (2016) 89-95.
- [178] S. Barbosa, N.K. Laureano, W.W. Hadiwikarta, F. Visioli, M. Bonrouhi, K. Pajdzik, C. Conde-Lopez, C. Herold-Mende, G. Eidt, R. Langie, M.L. Lamers, F. Stögbauer, J. Hess, I. Kurth, and A. Jou, The Role of SOX2 and SOX9 in Radioresistance and Tumor Recurrence. *Cancers (Basel)* 16 (2024).

- [179] M.D. Harati, H. Rodemann, and M. Toulany, Nanog Signaling Mediates Radioresistance in ALDH-Positive Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (2019).
- [180] N. Swain, M. Thakur, J. Pathak, and B. Swain, SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol* 24 (2020) 368-373.
- [181] S. Mirzaei, M.D.A. Paskeh, M. Entezari, S.R. Mirmazloomi, A. Hassanpoor, M. Aboutalebi, S. Rezaei, E.S. Hejazi, A. Kakavand, H. Heidari, S. Salimimoghadam, A. Taheriazam, M. Hashemi, and S. Samarghandian, SOX2 function in cancers: Association with growth, invasion, stemness and therapy response. *Biomed Pharmacother* 156 (2022) 113860.
- [182] H.-J. Lee, Y.-H. Kang, J.-S. Lee, J.-H. Byun, U.-K. Kim, S.-J. Jang, G.-J. Rho, and B.-W. Park, Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health* 15 (2015) 153.
- [183] M. Kołodziej-Rzepa, B. Biesaga, D. Słonina, and A. Mucha-Matecka, Nanog expression in patients with squamous cell carcinoma of oropharynx in relation to immunohistochemical score. *Pol J Pathol* 73 (2022) 60-71.
- [184] G. Grubelnik, E. Boštjančič, A. Aničin, T. Dovšak, and N. Zidar, MicroRNAs and Long Non-Coding RNAs as Regulators of NANOG Expression in the Development of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology* 10 (2021).
- [185] M.E. Charlson, P. Pompei, K.L. Ales, and C.R. MacKenzie, A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 40 (1987) 373-83.
- [186] S.G. Hakim, C. Taubitz, S. Hoppe, D. Steller, D. Rades, J. Ribbat-Idel, U. Alsharif, and M. Falougy, Prognostic impact of the loss of E-cadherin and de novo expression of N-cadherin at the invasive front of primary and recurrent oral squamous cell carcinoma. *Front Oncol* 13 (2023) 1151879.
- [187] C. Watermann, H. Pasternack, C. Idel, J. Ribbat-Idel, J. Brägelmann, P. Kuppler, A. Offermann, D. Jonigk, M.P. Kühnel, A. Schröck, E. Dreyer, C. Rosero, J. Nathansen, A. Dubrovskaja, L. Tharun, J. Kirfel, B. Wollenberg, S. Perner, and R. Krupar, Recurrent HNSCC Harbor an Immunosuppressive Tumor Immune Microenvironment Suggesting Successful Tumor Immune Evasion. *Clin Cancer Res* 27 (2021) 632-644.
- [188] J. Ribbat-Idel, S. Perner, P. Kuppler, L. Klapper, R. Krupar, C. Watermann, F.O. Paulsen, A. Offermann, K.L. Bruchhage, B. Wollenberg, and C. Idel, Immunologic "Cold" Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck Are Associated With an Unfavorable Prognosis. *Front Med (Lausanne)* 8 (2021) 622330.
- [189] J.C. de Vicente, P. Donate-Pérez Del Molino, J.P. Rodrigo, E. Allonca, F. Hermida-Prado, R. Granda-Díaz, T. Rodríguez Santamarta, and J.M. García-Pedrero, SOX2 Expression Is an Independent Predictor of Oral Cancer Progression. *J Clin Med* 8 (2019).
- [190] G. Grubelnik, E. Boštjančič, A. Grošelj, and N. Zidar, Expression of NANOG and Its Regulation in Oral Squamous Cell Carcinoma. *BioMed Research International* 2020 (2020) 8573793.
- [191] D. Rizzo, C. Graziani, R. Gallus, G. Zannoni, D. Lucchetti, C. Parrilla, A. Boninsegna, J. Galli, G. Paludetti, F. Bussu, and A. Sgambato, Stem cell markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas in relation to the site of origin and HPV infection: clinical implications. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* 40 (2020) 90-98.
- [192] P. Bankhead, M.B. Loughrey, J.A. Fernández, Y. Dombrowski, D.G. McArt, P.D. Dunne, S. McQuaid, R.T. Gray, L.J. Murray, H.G. Coleman, J.A. James, M. Salto-Tellez, and P.W. Hamilton, QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 7 (2017) 16878.

- [193] T. Jagomast, C. Idel, L. Klapper, P. Kuppler, L. Proppe, S. Beume, M. Falougy, D. Steller, S.G. Hakim, A. Offermann, M.C. Roesch, K.L. Bruchhage, S. Perner, and J. Ribbat-Idel, Comparison of manual and automated digital image analysis systems for quantification of cellular protein expression. *Histol Histopathol* 37 (2022) 527-541.
- [194] K.V. Ballman, Biomarker: Predictive or Prognostic? *J Clin Oncol* 33 (2015) 3968-71.
- [195] A. Weckx, M. Riekert, A. Grandoch, V. Schick, J.E. Zöller, and M. Kreppel, Time to recurrence and patient survival in recurrent oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 94 (2019) 8-13.
- [196] V. Giacomarra, G. Tirelli, L. Papanikolla, and R. Bussani, Predictive factors of nodal metastases in oral cavity and oropharynx carcinomas. *Laryngoscope* 109 (1999) 795-9.
- [197] S. Wenzel, C. Sagowski, W. Kehrl, and F.U. Metternich, The prognostic impact of metastatic pattern of lymph nodes in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 261 (2004) 270-5.
- [198] P. Caldeira, A.M.L. Soto, M. Aguiar, and C. Martins, Tumor depth of invasion and prognosis of early-stage oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Oral diseases* (2019).
- [199] M.J. Kim, and K.-M. Ahn, Prognostic factors of oral squamous cell carcinoma: the importance of recurrence and pTNM stage. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery* 46 (2024) 8.
- [200] D. Borsetto, J.A. Higginson, A. Aslam, L. Al-Qamachi, J. Dhanda, G. Marioni, S. Franchella, A. Frigo, P. Praveen, T. Martin, S. Parmar, and P. Nankivell, Factors affecting prognosis in locoregional recurrence of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 48 (2019) 206-213.
- [201] J.P. Rodrigo, M.Á. Villaronga, S.T. Menéndez, F. Hermida-Prado, M. Quer, I. Vilaseca, E. Allonca, D. Pedregal Mallo, A. Astudillo, and J.M. García-Pedrero, A Novel Role For Nanog As An Early Cancer Risk Marker In Patients With Laryngeal Precancerous Lesions. *Scientific Reports* 7 (2017) 11110.
- [202] L. Du, Y. Yang, X. Xiao, C. Wang, X. Zhang, L. Wang, X. Zhang, W. Li, G. Zheng, S. Wang, and Z. Dong, Sox2 nuclear expression is closely associated with poor prognosis in patients with histologically node-negative oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 47 (2011) 709-13.
- [203] K. Freier, K. Knoepfle, C. Flechtenmacher, S. Pungs, F. Devens, G. Toedt, C. Hofele, S. Joos, P. Lichter, and B. Radlwimmer, Recurrent copy number gain of transcription factor SOX2 and corresponding high protein expression in oral squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49 (2010) 9-16.
- [204] Y. Zhu, S. Huang, S. Chen, J. Chen, Z. Wang, Y. Wang, and H. Zheng, SOX2 promotes chemoresistance, cancer stem cells properties, and epithelial–mesenchymal transition by β -catenin and Beclin1/autophagy signaling in colorectal cancer. *Cell Death & Disease* 12 (2021) 449.
- [205] F. Yang, Y. Gao, J. Geng, D. Qu, Q. Han, J. Qi, and G. Chen, Elevated expression of SOX2 and FGFR1 in correlation with poor prognosis in patients with small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 6 (2013) 2846-54.
- [206] C.R. Jeter, B. Liu, X. Liu, X. Chen, C. Liu, T. Calhoun-Davis, J. Repass, H. Zaehres, J.J. Shen, and D.G. Tang, NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* 30 (2011) 3833-3845.
- [207] H. Wang, Y. Zhou, Q. Liu, J. Xu, and Yuqing, Prognostic value of SOX2, Cyclin D1, P53, and ki-67 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *OncoTargets and therapy* 11 (2018) 5171-5181.
- [208] Q. Li, F. Liu, Y. Zhang, L. Fu, C. Wang, X. Chen, S.-H. Guan, and X. Meng, Association of SOX2 and Nestin DNA amplification and protein expression with clinical features and overall survival in

- non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 7 (2016) 34520-34531.
- [209] Y. Chen, Y. Huang, Y. Huang, J. Chen, S. Wang, and J. Zhou, The Prognostic Value of SOX2 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 8 (2013).
- [210] B. Tanno, S. Leonardi, G. Babini, P. Giardullo, I. De Stefano, E. Pasquali, A. Saran, and M. Mancuso, Nanog-driven cell-reprogramming and self-renewal maintenance in Ptch1+/- granule cell precursors after radiation injury. *Scientific Reports* 7 (2017) 14238.
- [211] M. Chou, F.-W. Hu, C.H. Yu, and C.-C. Yu, Sox2 expression involvement in the oncogenicity and radiochemoresistance of oral cancer stem cells. *Oral oncology* 51 1 (2015) 31-39.
- [212] D. Hägerstrand, X. He, M.B. Lindh, S. Hoefs, G. Hesselager, A. Östman, and M. Nistér, Identification of a SOX2-dependent subset of tumor- and sphere-forming glioblastoma cells with a distinct tyrosine kinase inhibitor sensitivity profile. *Neuro-Oncology* 13 (2011) 1178-1191.
- [213] S. Wang, Z. Li, P.-P. Li, L. Li, Y. Liu, Y.-L. Feng, R. Li, and S. Xia, SOX2 Promotes Radioresistance in Non-small Cell Lung Cancer by Regulating Tumor Cells Dedifferentiation. *International Journal of Medical Sciences* 20 (2023) 781-796.
- [214] J.H. Chung, H.R. Jung, A.R. Jung, Y.C. Lee, M. Kong, J.-S. Lee, and Y.-G. Eun, SOX2 activation predicts prognosis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Scientific Reports* 8 (2018) 1677.

7. Danksagungen

Als Erstes möchte ich mich bei meiner Ehefrau bedanken. Sie war immer an meiner Seite, hat mich unterstützt und mir den Rücken freigehalten. Ohne ihre Liebe und Ermutigung hätte ich diesen Weg nicht so gehen können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Samer Hakim, für seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung, seine stetige Unterstützung sowie seine Geduld und Inspiration während der gesamten Promotionszeit. Durch seine kompetente Anleitung und sein Vertrauen in meine Arbeit hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Dr. Peter Sieg, der nicht nur meine Zeit in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie ermöglicht hat, sondern mich auch als Mentor auf meinem Weg in der Chirurgie begleitet und gefördert hat. Sein Rat, seine Unterstützung und seine wertvollen Rückmeldungen haben mich in meiner Entwicklung als Chirurg maßgeblich geprägt.

Ein herzliches Dankeschön an meine Kolleginnen und Kollegen aus der Pathologie, besonders an Dr. Julika Ribbat-Idel, die mir mit ihrer Hilfe und ihrem Wissen sehr zur Seite stand. Auch die technischen Mitarbeitenden der Pathologie haben mich großartig unterstützt – vielen Dank dafür!

Zum Schluss ein riesiges Dankeschön an meine Familie – meine Kinder, meine Mutter, meinen Bruder und meine Schwester. Ihr seid immer für mich da gewesen und ohne euch wäre dieser Moment nicht möglich gewesen.