

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
(Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. C.F. Hess)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Korrelation der p53-, EGFR- und SGLT1-Expression
im histopathologischen Präparat
mit den Nebenwirkungen und dem Outcome
einer primären Radio(chemo)therapie
bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Kopf-Hals-Tumor**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Hannah Siu-Fa Storf
aus
Tübingen

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer
Betreuer: PD Dr. med. H.A. Wolff
Ko-Referent: PD Dr. med. M. Schirmer
Promotor-Vertretung: Prof. Dr. R. Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Korrelation der p53-, EGFR- und SGLT1-Expression im histopathologischen Präparat mit den Nebenwirkungen und dem Outcome einer primären Radio(chemo)therapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Kopf-Hals-Tumor“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 25.04.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Abkürzungen.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals- Bereich	1
1.2 Histologie, Tumorlokalisierung und –klassifikation.....	2
1.3 Symptomatik und Diagnostik	3
1.4 Therapie	4
1.4.1 Durchführung der primären Radio(chemo)therapie	5
1.5 Akut- und Spätnebenwirkungen der Radio(chemo)therapie	6
1.6 Prognose der primären Radio(chemo)therapie	8
1.7 Molekulare Gewebemarker.....	9
1.7.1 p53	9
1.7.1.1 Struktur und Funktion.....	9
1.7.1.2 Expression von p53 und dessen Bedeutung im Rahmen der Kopf-Hals-Tumoren.....	12
1.7.2 Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR).....	13
1.7.2.1 Struktur und Funktion.....	13
1.7.2.2 Expression des EGFR und dessen Bedeutung im Rahmen der Kopf-Hals-Tumoren.....	16
1.7.3 Natrium/Glukose-Cotransporter SGLT1	17
1.7.3.1 Struktur und Funktion.....	17
1.7.3.2 Expression des SGLT1 und dessen Bedeutung im Rahmen der Kopf-Hals-Tumoren.....	19
1.8 Zielsetzung.....	21
2 Patienten, Probenakquirierung, Material und Methoden.....	24
2.1 Patientenkollektiv	24
2.2 Therapie des Primärtumors	25
2.3 Dokumentation der Toxizität und Follow-up	27
2.4 Probenakquirierung.....	28
2.5 Material	29
2.5.1 Chemikalien und Antikörper	29

2.5.2	Puffer und Lösungen.....	30
2.5.3	Laborkits	31
2.5.4	Geräte.....	31
2.5.5	Zubehör.....	32
2.5.6	Software	32
2.6	Methoden	33
2.6.1	Schnittpräparation.....	33
2.6.2	Entparaffinierung.....	33
2.6.3	Vorbehandlung.....	33
2.6.3.1	Vorbehandlung mit Protease.....	35
2.6.3.2	Vorbehandlung durch Erhitzen in Citratpuffer pH 6.....	35
2.6.4	Immunhistochemie.....	35
2.6.4.1	Allgemeines	35
2.6.4.2	Die (Strept-)Avidin-Biotin-Methode	38
2.6.4.3	Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.....	42
2.6.5	Histologische Auswertung.....	43
2.6.6	Statistische Auswertung.....	44
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Remission, Nachbeobachtungszeitraum und Gesamtüberleben	46
3.2	Expression der molekularen Gewebemarker	46
3.3	Korrelation der molekularen Gewebemarker	48
3.4	Toxizität.....	52
3.5	Expression molekularer Gewebemarker beim Auftreten höhergradiger Toxizität	55
3.5.1	Expression molekularer Gewebemarker bei der Ausbildung höhergradiger hämatotoxischer Nebenwirkungen	55
3.5.2	Expression molekularer Gewebemarker bei der Ausbildung organtoxischer Nebenwirkungen	56
3.5.3	Expression der molekularen Gewebemarker bei der Ausbildung höhergradiger Gesamtnebenwirkungen	59
3.6	Lokoregionäre Kontrolle sowie Auftreten von Fernmetastasen und Zweitumoren.....	60
3.7	Expression der molekularen Gewebemarker bezogen auf das Outcome...	61

3.7.1	Expression der molekularen Gewebemarker bezogen auf das krankheitsfreie Überleben.....	61
3.7.2	Expression der molekularen Gewebemarker bezogen auf das metastasenfremie Überleben.....	62
3.7.3	Expression der molekularen Gewebemarker bezogen auf die lokoregionäre Kontrolle.....	63
3.7.4	Expression der molekularen Gewebemarker bezogen auf das Gesamtüberleben.....	65
4	Diskussion.....	68
4.1	Expression und Korrelation der molekularen Gewebemarker.....	68
4.1.1	p53-Expression.....	68
4.1.2	EGFR-Expression.....	69
4.1.3	SGLT1-Expression.....	70
4.1.4	Korrelation der molekularen Gewebemarker.....	71
4.2	Expression der molekularen Gewebemarker beim Auftreten von Nebenwirkungen der primären Radio(chemo)therapie.....	73
4.3	Therapieergebnisse nach primärer Radio(chemo)therapie.....	75
4.3.1	Einfluss von p53 auf das klinische Outcome einer primären Radio(chemo)therapie.....	75
4.3.2	Einfluss des EGFR auf das klinische Outcome einer primären Radio(chemo)therapie.....	77
4.3.3	Einfluss des SGLT1 auf das klinische Outcome einer primären Radio(chemo)therapie.....	79
4.4	Ausblick und Problematik.....	81
5	Zusammenfassung.....	83
6	Literaturverzeichnis.....	86
7	Anhang.....	97
	Tabellenverzeichnis.....	97
	Tabellen.....	99
	Abbildungsverzeichnis.....	110
	Abbildungen.....	116

Verzeichnis der Abkürzungen

5-FU	5-Fluorouracil
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Methode
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
AR	<i>antigen retrieval</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CDK	<i>cyclin-dependent Kinase</i>
CTCAE	<i>common toxicity criteria for adverse events</i>
CT	Computertomographie
EC-Nummer	<i>enzyme commission-Nummer</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
erbB-1	Synonym für <i>epidermal growth factor receptor</i>
Fast Red KL	2-Carbamoyl-5-methoxybenzendiazonium
Fast Red TR	4-Chlor-2-methylbenzen-diazonium
FFPE	<i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GDP	Guanosindiphosphat
GLUT	Glukose-Transportprotein
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray (Bestrahlungseinheit)
HER-1	Synonym für <i>epidermal growth factor receptor</i>
H-Score	histologischer Score
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPV	humanes Papillomavirus
HRP	<i>horse reddish peroxidase</i> , Merrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IMRT	intensitätsmodulierte Radiotherapie
i.v.	intravenös
Jak	Januskinase
LENT-SOMA	<i>late effects on normal tissues; subjective objective management analysis</i>
LSAB-Methode	<i>labeled (strept-)avidin-biotin-Methode</i>

mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen-activated protein</i> Kinase
MG	Molekulargewicht; Angabe in [kDA]
MRT	Magnetresonanztomographie
Na ⁺	Natriumionen
Naphthol AS	3-Hydroxy-2-naphthoesäureanilid
Naphthol AS-MX Phosphat	3-Hydroxy-2-naphthoesäure 2,4-dimethylanilid Phosphat
pAK	polyklonaler Antikörper
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
pI	isoelektrischer Punkt
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C Gamma
pRb	Retinoblastomprotein
RapidArc	intensitätsmodulierte Rotationstechnik
SH3-Region	<i>Src-homology 3-Region</i>
SLC5	<i>solute carrier 5</i>
SCO2	<i>synthesis of cytochrom C oxidase 2</i>
SGLT1	<i>sodium glucose co-transporter 1</i> , Natrium/Glukose-Co-Transporter 1
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TGF- α	<i>transforming growth factor alpha</i>
TIGAR	<i>TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trpf.	Tropfen
TNM	<i>Tumor, Nodus, Metastasis</i>
TP53	humanes p53-Gen
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
VE-Wasser	vollständig entsalztes Wasser
wtp53	Wildtyp p53

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich

Weltweit werden Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs mit mehr als 550.000 Neuerkrankungen und einer Mortalität von 350.000 Patienten jährlich beziffert (Jemal et al. 2011). Laut einer Studie der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister und des Robert Koch-Institutes stellt diese Tumorentität mit 11.360 Neuerkrankungen pro Jahr bei männlichen Patienten die siebthäufigste Krebserkrankung in Deutschland dar (Husmann et al. 2010). Bei Frauen sind die Malignome des Kopf-Hals-Bereichs für ca. 3.390 der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland verantwortlich und liegen damit an 16. Stelle der häufigsten Krebserkrankungen (Husmann et al. 2010). Proportional zur steigenden Anzahl der weiblichen Raucherinnen kann auch eine Zunahme der Inzidenz beobachtet werden. Während das mittlere Erkrankungsalter bei Frauen bei 64 Jahren liegt, erkranken Männer im Schnitt bereits mit 60 Jahren. Der Altersgipfel zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt bei beiden Geschlechtern zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr (Husmann et al. 2010).

Die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren ist multifaktoriell bedingt. Mindestens 75 % der Tumore sind auf eine Kombination aus Nikotin- und Alkoholabusus zurückführbar (Blot et al. 1988). Damit stellen diese beiden Noxen, sowohl unabhängig voneinander als auch synergistisch, die Hauptrisikofaktoren in industrialisierten Ländern dar.

Raucher weisen im Vergleich zu Nichtrauchern ein erhöhtes Erkrankungsrisiko auf, das im Sinne einer Dosis-Wirkungsbeziehung mit der Häufigkeit, Dauer und Anzahl der konsumierten Zigaretten weiter zunimmt (Hashibe et al. 2007). Auch andere Formen des Tabakkonsums wie Zigarren- und Pfeifenrauchen, aber auch Kau- und Schnupftabak, sind assoziiert mit einer Zunahme der Inzidenz (Blot et al. 1988).

Das Erkrankungsrisiko steigt multiplikativ bei zusätzlichem Alkoholmissbrauch vor allem für Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome (Blot et al. 1988). Bei kombiniertem Abusus zeigt sich in der Bevölkerung ein attributables Risiko von 37 % im Vergleich zu 4 % bei alleinigem Alkoholmissbrauch (Hashibe et al. 2009).

Eine Infektion mit Hochrisiko-humanen Papillomaviren (HPV), insbesondere HPV 16 und 18, stellt in etwa 26 % der Fälle einen weiteren Risikofaktor für die

Entwicklung eines Tumors im Kopf-Hals-Bereich dar (Hashibe et al. 2007). Eine HPV-Assoziation wird meistens bei Karzinomen des Oropharynx beobachtet, betroffen sind häufig Patienten ohne Nikotin- oder Alkoholanamnese.

Slaughter et. al. etablierten 1953 den Ausdruck der *field cancerization* zur Beschreibung von multipel lokalisierten, neoplastischen Sekundärläsionen als Reaktion auf Umweltkarzinogene (Slaughter et al. 1953).

Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zeigt sich außerdem bei unzureichender Mundhygiene sowie mechanischen Irritationen z.B. durch Prothesen. Einer obst- und gemüsereichen Ernährung werden hingegen protektive Effekte zugeschrieben (Boenninghaus und Lenarz 2007).

1.2 Histologie, Tumorlokalisation und –klassifikation

Der Begriff der Kopf-Hals-Tumoren umfasst Karzinome im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes einschließlich der Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx, wobei Karzinome des Nasopharynx meist separat betrachtet werden. Mit über 90 % stellen Plattenepithelkarzinome den größten Anteil der soliden Tumoren im Kopf-Hals-Bereich dar. Andere Tumorentitäten, wie z.B. Adenokarzinome, Karzinome lymphoepithelialen Ursprungs oder Sarkome kommen weitaus seltener vor.

Am häufigsten betroffen ist die Mundhöhle, gefolgt von Larynx und Pharynx (Preiß et al. 2012).

Die Mundhöhle lässt sich topographisch in sechs anatomische Bezirke gliedern, die Mundschleimhaut, oberer und unterer Alveolarfortsatz, harter Gaumen, Mundboden, der Zungenrücken vor den Papillae vallatae sowie die Zungenunterseite.

Ein Befall des Zungengrundes, des Gaumenbogens mit Tonsillen, der Uvula oder der oberen Fläche des weichen Gaumens wird unter dem Begriff des Oropharynx-Karzinoms subsumiert.

Der Hypopharynx verbindet Oropharynx und Ösophagus, ventral weist er einen Eingang in den Kehlkopf auf. Unterteilt werden die Karzinome des Hypopharynx nach drei Bereichen: Postkrikoidgegend, Recessus piriformis und Hypopharynxhinterwand.

Am Larynx werden supraglottische, glottische und subglottische Karzinome differenziert. Die supraglottischen Karzinome umfassen Raumforderungen der suprahyoidalen Epiglottis, der aryepiglottischen Falte, der laryngealen Anteile der

Arytaenoidgegend sowie der infrahyoidalen Epiglottis und der Taschenfalten. Tumoren der Glottis können sich im Bereich der Stimmlippen sowie der vorderen und hinteren Kommissur manifestieren. Der subglottische Bereich wird nicht weiter unterteilt. Maligne Raumforderungen, die alle drei Teilbereiche des Larynx befallen und deren ursprünglicher Entstehungsort nicht mehr erkennbar ist, werden als transglottische Karzinome bezeichnet.

Die klinische Klassifikation der Neoplasien erfolgt nach dem sog. TNM-System (T: Tumor, N: Nodus, M: Metastasis), basierend auf der Lokalisation des Primärtumors sowie dessen lymphogener und hämatogener Ausbreitung (siehe Tabelle 8 bis Tabelle 15 im Anhang) (Wittekind und Meyer 2010).

Auf dieser prätherapeutischen Einteilung aufbauend erfolgt eine Einstufung in Stadien nach der *Union internationale contre le cancer* (UICC) und ergänzend die histologische Klassifikation des Differenzierungsgrades, das sog. *Grading*, anhand morphologischer Gesichtspunkte, wie z.B. Kernatypien und Zellschichtung (vgl. Tabelle 16 und Tabelle 17 im Anhang) (Preiß et al. 2012; Wittekind und Meyer 2010).

1.3 Symptomatik und Diagnostik

Die Symptomatik der malignen Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich ist abhängig von der Tumorausbreitung und -lokalisation. Eine spezifische Frühsymptomatik findet sich selten. Betroffene Patienten kommen häufig erst in fortgeschrittenen Stadien zur Primärdiagnostik.

Eine maligne Neoplasie im Bereich der Mundhöhle kann sich unter anderem mit brennenden Schmerzen, blutigtingiertem Speichel und Foetor ex ore bemerkbar machen. Bei Karzinomen im Bereich des Oropharynx kann es bereits frühzeitig zu einseitigen Schluckbeschwerden kommen. Im Verlauf können eine kloßige Sprache und Otalgien auftreten.

Ein Primärsymptom des glottischen Karzinoms ist eine Veränderung der Stimme in Form von Heiserkeit. Subglottische Karzinome können sich mit Dyspnoe und inspiratorischem Stridor bemerkbar machen. Supraglottische Malignome und Hypopharynxkarzinome bleiben dagegen lange symptomarm. Starke Schmerzen oder eine Funktionseinschränkung durch Kieferklemme machen sich erst in fortgeschrittenen Stadien bemerkbar. In vielen Fällen sind daher eine einseitige

Schwellung im Halsbereich oder Halslymphknotenmetastasen als Initialsymptom wegweisend.

Die Verdachtsdiagnose ergibt sich nach Zusammenschau der klinischen Befunde. Neben einer Spiegeluntersuchung des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs (HNO-Bereich) erfolgt eine gründliche Palpation der Halsweichteile zur Erfassung von Lymphknotenmetastasen. Als empfindlichste Methode zur Erfassung einer frühen Infiltration und Beeinträchtigung der Stimmlippen hat sich die Stroboskopie erwiesen.

Zur histopathologischen Sicherung der Diagnose erfolgt die Biopsie des Primärtumors oder einer zugänglichen regionären Lymphknotenmetastase.

Per Panendoskopie mit Ösophago- und Bronchoskopie wird die Ausdehnung des Primärtumors beurteilt bzw. das Auftreten von Zweitkarzinomen ausgeschlossen.

Bildgebende Verfahren wie Sonographie, Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) können zu Verifizierung der Tumorausdehnung besonders hinsichtlich Tiefeninfiltration, Beteiligung von Nachbarstrukturen und zur Beurteilung des regionären Lymphknotenstatus genutzt werden.

Bewahrheitet sich der Verdacht auf ein Malignom erfolgt prätherapeutisch die Komplettierung des Stagings in Form einer Röntgenuntersuchung des Thorax in zwei Ebenen zur Suche pulmonaler Filiae sowie einer Sonographie des Abdomens insbesondere zum Ausschluss hepatischer Metastasen. Gegebenenfalls können diese Untersuchungen durch CT-Aufnahmen von Thorax und Abdomen ergänzt werden. Bei klinischem Verdacht auf Knochenmetastasen oder hohes Metastasierungsrisiko ergibt sich die Indikation einer Skelettszintigraphie.

1.4 Therapie

Abhängig von den Ergebnissen des vorangegangenen Stagings wird generell zwischen Behandlungsansätzen in kurativem oder palliativem Setting unterschieden. Eine Therapie mit palliativer Zielsetzung in Form von Symptomkontrolle wird bei Patienten verfolgt, bei denen eine Heilung aufgrund von Fernmetastasen nicht mehr möglich ist.

Ist die Tumorausbreitung lokoregionär begrenzt, ist ein kurativer Therapieansatz möglich, d.h. die vollständige Heilung des Patienten wird angestrebt. Ziel ist die vollständige Resektion bzw. Remission des Primärtumors sowie befallener lokoregionärer Lymphknoten mittels einer multimodalen Therapie.

Die Entscheidung, welche Therapieform Anwendung findet, erfolgt stadiengerecht und ist abhängig von dem Allgemeinzustand und Wunsch des Patienten. Prinzipiell stehen heutzutage sowohl primär chirurgische als auch primär radio(chemo)-therapeutische Behandlungsansätze zur Verfügung.

Sofern eine Operation in kurativer Intention möglich ist, wird in Europa bei jedem Patienten in UICC-Stadien I und II primär die vollständige chirurgische Exzision des Tumors angestrebt.

Sollten ein fortgeschrittener Lokalbefund vorliegen oder es Hinweise auf einen Lymphknotenbefall im Rahmen des Stagings geben, wird zusätzliche eine Neck Dissection durchgeführt.

Alternativ, im angloamerikanischen Raum bevorzugt, steht vor allem bei glottischen Frühkarzinomen im Stadium T1-2 N0 auch die alleinige Radiotherapie mit kurativem Ansatz zur Verfügung (Boenninghaus und Lenarz 2007).

Eine postoperative adjuvante Radiotherapie ist ab UICC-Stadium III (pT3 oder pN+) bzw. bei Lymphinvasion oder Residualtumor (R1-Resektion) indiziert (Pfister et al. 2011).

Sollte sich der Tumor in einem fortgeschritteneren Stadium (UICC III, IV A/B) als inoperabel herausstellen bzw. ist eine Operation schon in früheren Tumorstadien aufgrund des Allgemeinzustandes des Patienten nicht möglich, wird eine primäre Radiotherapie präferiert (Pfister et al. 2011).

Sowohl bei der primären als auch bei der adjuvanten Radiotherapie zeigen sich in Studien bessere Ergebnisse durch eine simultane Chemotherapie. Anhand von Metaanalysen konnte gezeigt werden, dass eine konkominante Chemotherapie in beiden Fällen sowohl die lokale Kontrolle als auch das Gesamtüberleben verbessern konnte (Budach et al. 2006; Pignon et al. 2009).

1.4.1 Durchführung der primären Radio(chemo)therapie

Standard bei der Durchführung einer kurativen, primären Radiotherapie ist die normofraktionierte Bestrahlung. Das Zielvolumen, bestehend aus Primärtumor plus regionäre Lymphknotenstationen, wird fünfmal wöchentlich mit einer Tagesdosis von 2 Gy über sieben bis acht Wochen bis zu einer Gesamtdosis von mindestens 66-74 Gy bestrahlt.

In den letzten Jahrzehnten stellte sich eine Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle und des Gesamtüberlebens durch simultane Applikation einer Chemotherapie heraus

(Brizel et al. 1998; Wendt et al. 1998). Die konkominante Radiochemotherapie ist daher mittlerweile Goldstandard bei der Behandlung fortgeschrittener, inoperabler Kopf-Hals-Tumoren. Die optimale Wahl der Zytostatika und des Chemotherapie-Schemas ist nach wie vor Ziel vieler Studien. Pignon et al. wiesen 2009 in einer Metaanalyse einen Überlebensvorteil unter Mitomycin C, Bleomycin, 5-Fluorouracil (5-FU) oder Platinderivaten kombiniert mit einem normofraktionierten Bestrahlungsschema nach (Pignon et al. 2009). Alternativ zeigt sich auch unter einer simultanen Gabe unterschiedlicher Chemotherapeutika wie z.B. 5-FU in Kombination mit Cisplatin ein verbessertes Gesamtüberleben (Budach et al. 2006). Sollten bei inoperablen Tumoren Kontraindikationen gegen eine Chemotherapie bestehen oder wird diese vom Patienten abgelehnt, kommt eine alleinige Radiotherapie zum Einsatz.

Alternativ zur alleinigen Radiotherapie besteht die Zulassung zur Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab in Kombination mit der Bestrahlung. Diese Antikörpertherapie richtet sich gegen die ligandenbindende Domäne des EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) (Bonner et al. 2006). Die Applikation des Antagonisten Cetuximab startet eine Woche vor Beginn der Radiotherapie und wird anschließend begleitend bis zum Ende der Therapie fortgesetzt. Durch die Kombination von hochdosierter Radiotherapie und Cetuximab kann im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie eine Verbesserung sowohl der lokoregionären Kontrolle als auch eine Reduktion der Mortalität ohne Steigerung der allgemeinen, bestrahlungsbedingten Nebenwirkungen erreicht werden (Bonner et al. 2006).

Aufgrund fehlender Vergleichsstudien bleibt es bislang allerdings noch unklar, ob eine Kombination aus Bestrahlung und Cetuximab genauso effektiv ist wie die Kombination aus Radio- und Chemotherapie (Merlano und Occelli 2007).

1.5 Akut- und Spätnebenwirkungen der Radio(chemo)therapie

Neben dem Outcome sind die therapiebedingten Nebenwirkungen ein wichtiger Endpunkt der onkologischen Therapie.

Prinzipiell ist zwischen akuten und späten Nebenwirkungen der Radiochemotherapie zu unterscheiden. Akute Nebenwirkungen treten innerhalb von 90 Tagen nach Therapiebeginn auf.

Zur Erfassung der akuten Nebenwirkungen dienen die vom National Cancer Institute entwickelten *common toxicity criteria for adverse events* (CTCAE) (Seegenschmiedt

et al. 1999; Trotti et al. 2003). In zwölf Haupt- und zusätzlichen organspezifischen Nebenkriterien lassen sich die Nebenwirkungen einer Radiochemotherapie systematisch dokumentieren. In einer sechsteiligen Abstufung erfolgt prospektiv die Einteilung in geringe/leichte (Grad 1), mäßige/deutliche (Grad 2), starke/ausgeprägte (Grad 3) und lebensbedrohliche (Grad 4) Schweregrade. Grad 0 beschreibt einen nebenwirkungsfreien Verlauf, Grad 5 dagegen umfasst organspezifische Nebenwirkungen, die zum Tode führen.

Typische Akutnebenwirkungen der Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren sind vor allem Organtoxizität in Form von Mukositis, Hautreaktionen im Sinne einer Radiodermatitis und Dysphagie (Wolff et al. 2010). Außerdem kann es zu Übelkeit sowie durch die Bestrahlung blutbildender Zellen zu einer zu akuten Veränderung des Blutbildes kommen. Tabelle 18 bis Tabelle 23 im Anhang liefern einen Überblick über mögliche Nebenwirkungen.

Therapiebedingte Auswirkungen, die ab dem 91. Tag auftreten, gelten als späte Nebenwirkungen. Diese Langzeitfolgen der onkologischen Therapie werden in sechs Schweregraden (Grad 1: gering/leicht, Grad 2: mäßig/deutlich, Grad 3: stark/ausgeprägt, Grad 4: lebensbedrohlich) im LENT-System erfasst. Ergänzend gibt es wie bei den CTCAE Grad 0 (keine Nebenwirkungen) und Grad 5 (letale Nebenwirkungen).

Die Akronyme LENT-SOMA stehen für Spätfolgen am Normalgewebe (LENT-*late effects on normal tissues*) sowie für vier zusätzlich zu jedem Organsystem erfasste Dimensionen: subjektive, objektive, therapiebedingte Kriterien und Analyseverfahren (SOMA-*subjective objective management analysis*) (Rubin et al. 1995).

Der Begriff „subjektive Kriterien“ umfasst die subjektive Beschreibung von klinischen Symptomen wie z.B. Schmerzen durch den Patienten. Es wird unterschieden zwischen gelegentlich, intermittierend, persistierend und refraktär.

Durch klinische Untersuchung, Labor oder Bildgebung objektiv erfasste Parameter wie z.B. Gewichtsverlust oder Ödeme werden unter dem Begriff „objektive Kriterien“ evaluiert.

Der Punkt „Therapiebedingte Kriterien/Management“ erfasst gezielte Therapiemaßnahmen bei organspezifischen Nebenwirkungen. Unter „Analyse“ werden Verfahren dokumentiert, wie z.B. Sonographie, CT, MRT, die eine spezifischere Quantifizierung und Validierung der Spätfolgen ermöglichen sollen.

Das mögliche Auftreten von Zweittumoren wird in dem LENT-SOMA-System nicht erfasst (Seegenschmiedt et al. 2000).

Typische radiogene Spätfolgen im Kopf-Hals-Bereich sind Xerostomie, chronische Hautveränderungen, Schluckstörungen, Störung des Geschmacksinns, das Auftreten eines zervikalen Lymphödems, Fistelbildung und Osteonekrosen (Karstens et al. 2010).

1.6 Prognose der primären Radio(chemo)therapie

Trotz multimodaler Therapieansätze bei lokal fortgeschrittenen, inoperablen Kopf-Hals-Tumoren (UICC III, IV A/B) beträgt das 5-Jahres Gesamtüberleben nur 20 bis 30 % (Adelstein und Leblanc 2006; Suntharalingam et al. 2001). Ca. 50 % der Patienten mit lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren entwickeln innerhalb der ersten zwei Jahre nach Behandlung lokale Rezidive oder Fernmetastasen (Argiris et al. 2008).

Das Ausmaß der zervikalen Lymphknotenmetastasierung erweist sich bislang als aussagekräftigster Indikator bezogen auf ein Wiederauftreten des Tumors (Grandis et al. 1998). Die Wahrscheinlichkeit eines Langzeitüberlebens ist bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen um 50 % reduziert (Sanderson und Ironside 2002)

Zweittumore, die den gesamten Aerodigestivtrakt betreffen können, entwickeln sich bei ca. 15 % der Patienten (Cooper et al. 1989).

Als aussagekräftigste Indikatoren für die Prognose einer primären Radiochemotherapie gelten bislang das T-Stadium (Griffin et al. 1984), das Grading (Adelstein und Leblanc 2006), das Geschlecht (Overgaard et al. 1986), das Alter (Suntharalingam et al. 2001), die Lokalisation (Griffin et al. 1984) und der prätherapeutische Hämoglobinwert (Schäfer et al. 2003).

Das Ziel bleibt nach wie vor eine Reduktion der therapeutischen Nebenwirkungen bei effizienter Krankheitskontrolle. Daher ist ein Forschungsinhalt die Identifizierung relevanter molekularer Biomarker, mit deren Hilfe sich eine frühzeitige Aussage zu der Prognose des Krankheitsverlaufs bzw. zum Auftreten von therapieassoziierten Nebenwirkungen treffen lässt.

1.7 Molekulare Gewebemarker

1.7.1 p53

1.7.1.1 Struktur und Funktion

1979 entdeckten mehrere Forschergruppen fast zeitgleich das Protein p53 im Zusammenhang mit dem DNA-Virus Simian-Virus 40 (Kress et al. 1979; Lane und Crawford 1979; Linzer und Levine 1979). Da das Protein als zellulärer Partner von Onkoproteinen beschrieben wurde und eine Akkumulation in Tumorzellen beobachtet wurde, ging man initial davon aus, dass es sich auch bei p53 um ein Onkoprotein handle (Linzer und Levine 1979).

Eine Dekade später wurde diese ursprüngliche Annahme revidiert und p53 als Tumorsuppressor identifiziert (Baker et al. 1989).

Unter physiologischen Bedingungen befindet sich das Wildtypprotein (wtp53) im Standby-Modus und wird sowohl durch regulatorische Proteine als auch durch seine relativ kurze Halbwertszeit (ca. 20 Minuten) in einer niedrigen Konzentration gehalten. Als Antwort auf zellulären Stress kommt es über unterschiedliche posttranslationale Veränderungen zu einer Stabilisierung und nukleären Akkumulation des Proteins. Als Auslöser gelten DNA-Schäden z.B. infolge von Gammastrahlen. Aber auch Hypoxie, Aktivierung von Onkogenen und Abbau von Ribonukleotiden sind endogen oder exogen stressauslösende Signale, die zu einer Anreicherung des Proteins führen (Vousden und Lu 2002).

wtp53 reguliert über seine sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität die Expression unterschiedlicher Zielgene, kann aber auch über Protein-Protein-Interaktion agieren. In seiner Funktion als Tumorsuppressorprotein werden p53 Aufgaben bezüglich Zellzykluskontrolle, Seneszenz, Proliferation und Apoptose zugeschrieben.

Vereinfacht formuliert kommt es je nach Ausmaß der zellulären Schäden entweder zum Zellzyklusarrest oder zum apoptotischen Zelltod.

Bei reparablen Schäden sorgt p53 für die Transkription von p16 und p21, die an Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) binden und diesen Komplex inhibieren. Dadurch wird die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (pRb) verhindert. In diesem nichtphosphorylierten Zustand inhibiert das pRb den E2F-Transkriptionsfaktor-Komplex und damit den Progress des Zellzyklus in die

Synthesephase. Die G1-Phase des Zellzyklus wird für notwendige DNA-Reparaturen verlängert. Auch der Übergang von der G2 in die Mitose-Phase wird durch den negativen Effekt von p21 auf die CDKs reguliert.

Bei irreparablen Schäden des Genoms kommt es zu einer Einleitung des programmierten Zelltodes, der Apoptose. p53 reguliert pro-apoptische Effektorproteine wie BAX, BAK, PUMA und NOXA und anti-apoptischer Faktoren der bcl-Familie. Die mitochondriale Membran wird permeabel und Cytochrom C wird freigesetzt. Es kommt zu einer kaskadenartigen Aktivierung von Signal-Caspasen. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung über die Funktion von p53 im Rahmen der Zellzykluskontrolle.

Obwohl p53 als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl seiner Funktionen vom Zellkern ausgehend steuert, kommt es nicht nur im Rahmen des Proteinabbaus zum Kernexport. Eine Translokation von p53 ins Zytoplasma bewirkt über direkte Interaktion mit Proteinen der bcl-Familie die Freisetzung pro-apoptischer Proteine aus den Mitochondrien (Green und Kroemer 2009).

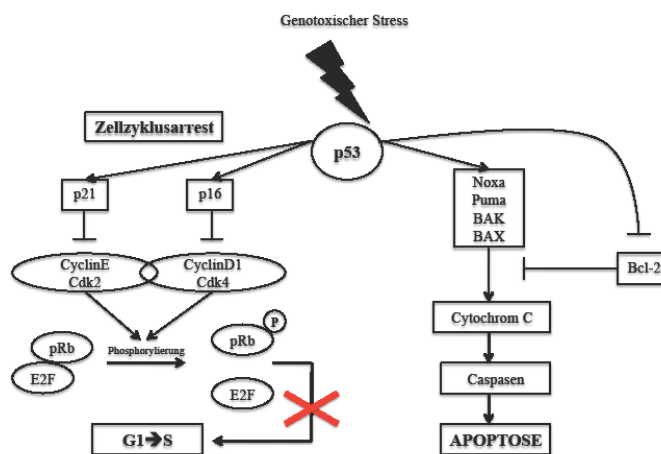


Abbildung 1: Übersicht über die Funktion von p53 im Rahmen der Zellzykluskontrolle (modifiziert nach Weinberg 2014, S. 385)

Das humane p53-Gen (TP53), das auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert ist, kodiert für ein Protein bestehend aus 393 Aminosäuren, welche sich in vier strukturellen und funktionellen Domänen organisieren (Römer et al. 2006).

Die aminoterminal Domäne umfasst die Transaktivierungsdomäne, außerdem beinhaltet sie eine Prolin-reiche SH3-Region (Src-Homology 3-Region), welche eine wichtige Rolle bei pro-apoptotischen Funktionen von p53 spielt (Weinberg 2014). Sie ist in nativem Zustand ungefaltet und fungiert als Zielstruktur für die Interaktion mit anderen Proteinen.

Verantwortlich für die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 ist die größte, zentral lokalisierte Domäne. Eine definierte Oligomerisierungsdomäne vermittelt die native Struktur des Proteins. In Lösung bildet sich durch hydrophobe Wechselwirkungen aus zwei Dimeren ein Tetramer, das hohe Affinität zur Konsensus-DNA aufweist (Römer et al. 2006). Über eine basische Linkerregion schließt sich die carboxyterminale Region an. Diese Domäne vermittelt unter anderem negativ regulatorische Einflüsse auf die spezifische DNA-Bindung des Gesamtproteins (Weinberg 2014).

Schätzungsweise mehr als 50 % aller humanen Krebsformen zeigen Mutationen des p53-Proteins, wobei die Häufigkeit der Mutationen von Krebstyp zu Krebstyp variiert (Brosh und Rotter 2009; Levine 1997; Petitjean et al. 2007).

Die Mehrheit der p53-Mutationen finden sich in der Domäne, die für die sequenzspezifische DNA-Bindung verantwortlich ist (Vousden und Lu 2002). Im Gegensatz zu einem Großteil der Tumorsuppressorgene, die häufig durch Deletionen oder Nonsense-Mutationen verändert werden, handelt es sich dabei hauptsächlich um Punktmutationen in Form von Missense-Mutationen (Freed-Pastor und Prives 2012). Die Mutation eines Allels führt zu einem partiellen Verlust der Wildtyp-Funktionen. Das mutierte Protein kann außerdem als dominant-negativer Inhibitor fungieren, indem die DNA-Bindung und Transaktivierungsaktivität des verbleibenden Wildtyps durch gemischte Tetramerisierung gehemmt wird (de Vries et al. 2002). Neben einer Inaktivierung durch ein mutiertes p53-Protein, kann der Wildtyp auch durch Bindung an virale Proteine (z.B. HPV E6) inaktiviert werden.

Im Laufe des weiteren Tumorprogresses mutiert das verbleibende wtp53 häufig oder wird im Sinne eines *loss of heterozygosity* eliminiert (Brosh und Rotter 2009).

Resultat ist ein mutiertes p53-Protein, das - im Gegensatz zum Wildtyp - in einer stabileren Form in hohen Konzentrationen in den Tumorzellen akkumuliert (Rotter 1983).

Neben dem Verlust der Tumorsuppressorfunktionen zeigen einige der mutierten p53-Isoformen auch onkogene Eigenschaften. Die Literatur bezeichnet diese als *gain of function* (Oren und Rotter 2010). Betroffen sind unterschiedliche Punkte der Tumorgenese wie genomische Instabilität, DNA-Synthese und Proliferation, Antiapoptose, Chemoresistenz, Förderung von Angiogenese, Invasion und Metastasierung (Brosh und Rotter 2009; Freed-Pastor und Prives 2012; Oren und Rotter 2010).

1.7.1.2 Expression von p53 und dessen Bedeutung im Rahmen der Kopf-Hals-Tumoren

Immunhistochemische Untersuchungen weisen sowohl das Vorhandensein von wtp53 als auch mutierter Formen des Proteins in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs nach. Jedoch geht man davon aus, dass es sich bei einem positiven Färbeergebnis um ein Protein mit defekter Funktion im Sinne einer mutierten Form bzw. inaktivierten Wildtyps handelt (Mineta et al. 1998).

Eine gesteigerte Expression wird vor allen Dingen bei Patienten mit ausgeprägter Nikotinanamnese beobachtet (Field et al. 1991).

In 40-50 % der Fälle zeigen sich Mutationen des p53-Gens (Greenblatt et al. 1994). Wie unter 1.7.1.1 beschrieben, handelt es sich dabei hauptsächlich um Missense-Mutationen. Typische, sogenannte hotspots betreffen Exon 5-8.

Veränderungen der p53-Expression zeigen sich teilweise schon in gesundem, tumorumgebenden Gewebe, was auf ein frühes Auftreten der Mutationen im Rahmen der Karzinogenese und eine mögliche Rolle bei der *field cancerization* hinweisen könnte (Califano et al. 1996; Nees et al. 1993).

Zugleich zeigt sich jedoch auch zusammen mit dem Tumorprogress eine Zunahme der Inzidenz der p53-Mutationen (Boyle et al. 1993).

Welche Rolle p53 als prognostischer Marker der Kopf-Hals-Tumoren spielt, wird nach wie vor kontrovers diskutiert.

Unter Betrachtung der gesamten Tumorentität der Kopf-Hals-Tumoren konnten viele Studien bislang keinen Zusammenhang zwischen der Expression des p53-Proteins und der Prognose nachweisen (Chin et al. 2005; Kumar et al. 2008b).

Bei Eingrenzung der Fragestellung und Studienbedingungen, unter Betrachtung einzelner Therapieformen, Tumorentitäten oder –stadien, zeigten sich zum Teil andere Ergebnisse: So kamen unterschiedliche Studien zu dem Ergebnis, dass sich

p53-Mutationen und zum Teil auch eine gesteigerte Expression des Proteins auf das Outcome der Patienten mit kürzerem krankheitsfreiem Überleben oder kürzerem Gesamtüberleben auswirken (Mineta et al. 1998; Poeta et al. 2007; Sauter et al. 1995). Poeta et. al. unterschieden in ihrer Arbeit zwischen „disruptiven“ Mutationen und „nicht-disruptiven“ Mutationen, wobei erstere in der DNA-Bindungsdomäne oder in Stoppcodons lokalisiert und für die Bildung fragmentierter Proteine verantwortlich sind (Poeta et al. 2007). Das Vorhandensein dieser „disruptiven“ Mutationen war bei Patienten, die in kurativer Intention operativ therapiert wurden, mit einem schlechteren Outcome verbunden. Sauter et al. beobachteten eine Korrelation der p53-Expression mit einer schlechteren Prognose bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, die bereits lokale, regionale oder Fernmetastasen aufwiesen (Sauter et al. 1995). Auch eine Verschlechterung der lokoregionären Kontrolle im Anschluss an eine primäre Radiotherapie konnte beobachtet werden (Alsner et al. 2001).

Diese Ergebnisse werden von Studien ergänzt, die ein höheres Risiko für ein Therapieversagen bei Patienten mit p53-Mutationen bei 5-FU- und platinbasierter Chemotherapie beschreiben (Cabelguenne et al. 2000; Temam et al. 2000).

In einer prospektiven Studie zur Korrelation von p53-Veränderungen und dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie, bestehend aus 5-FU und Cisplatin, fand sich eine signifikant höhere Prävalenz an p53-Mutationen in der Patientengruppe, die kein Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie zeigte im Vergleich zu der Patientengruppe mit komplettem oder zumindest partiellem Ansprechen (81 % vs. 57 %, $p < 0,04$) (Cabelguenne et al. 2000). Auch die Analyse von 107 Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren (UICC III und IV), die eine Induktionschemotherapie erhielten, zeigte ein drei- bis vierfach schlechteres Therapieansprechen bei Patienten mit p53-Mutationen (Temam et al. 2000).

1.7.2 Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR)

1.7.2.1 Struktur und Funktion

Mitte der 70er Jahre konnte Graham Carpenter erstmals das Vorhandensein eines spezifischen Rezeptors für proliferationsfördernde Liganden auf epithelialen Zellen nachweisen (Carpenter et al. 1975). Mittlerweile ist bekannt, dass dieser sog.

epidermal growth factor-receptor (EGFR) eine Schlüsselrolle im Rahmen einer Vielzahl zellulärer Prozesse einnimmt.

Der EGFR (auch erbB-1 oder HER-1 genannt) ist einer von vier, strukturell und funktionell eng verwandten transmembranösen Rezeptorproteinen, die zusammen die Gruppe der erbB- oder HER-Rezeptor-Tyrosinkinase bilden. Die Bezeichnung erbB geht auf die Strukturverwandschaft des EGF-Rezeptors zu dem v-ErbB-Onkoprotein des aviären Erythroblastose-Virus zurück. Weitere Mitglieder dieser Rezeptorgruppe sind erbB-2/ HER2, erbB-3/ HER3 und erbB-4/ HER4.

Der humane EGF-Rezeptor ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa.

Ein auf dem menschlichen Chromosom 7p12 lokalisiertes Gen kodiert für eine Polypeptidkette, bestehend aus 1186 Aminosäuren, die über Stickstoffbindungen mit Oligosaccharid-Ketten verbunden sind (Carpenter und Cohen 1990). Der Rezeptor endet extrazellulär N-terminal, das C-terminale Ende ist intrazellulär gelegen.

Funktionell besteht der Rezeptor aus drei Teilen: einer extrazellulären, cysteinreichen, ligandenbindenden Domäne, einer hydrophoben, transmembranösen Region und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinasefunktion sowie mehreren Phosphorylierungsstellen (vgl. Abbildung 2).

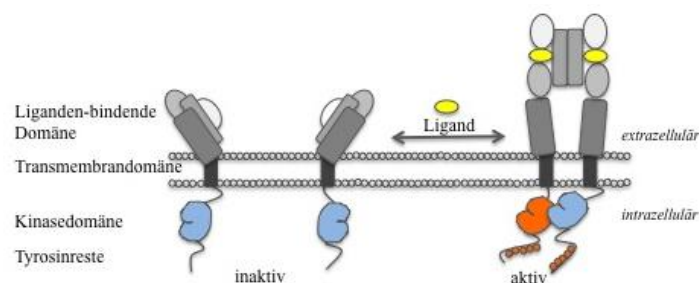


Abbildung 2: Struktureller Aufbau des EGFR als Homomer und in dimerisierter Form (modifiziert nach Kumar et al. 2008a, S. 1744)

Zur Aktivierung kommt es in der Regel durch Bindung von extrazellulären Liganden an die Ektodomäne. Man geht davon aus, dass der *epidermal growth factor* (EGF) und der *transforming growth factor α* (TGF- α) zu den wichtigsten Liganden des EGF-Rezeptors gehören (Herbst 2004).

Die Bindung löst eine Homodimerisierung des Rezeptors oder eine Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren der HER-Familie (v.a. HER-2) an der Zelloberfläche aus. Folge dieser Konformationsänderung ist die Bildung möglicher

Bindungsstellen für Effektormoleküle durch Autophosphorylierung der zyttoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne.

Abbildung 3 zeigt eine Übersicht der wichtigsten Signalwege.

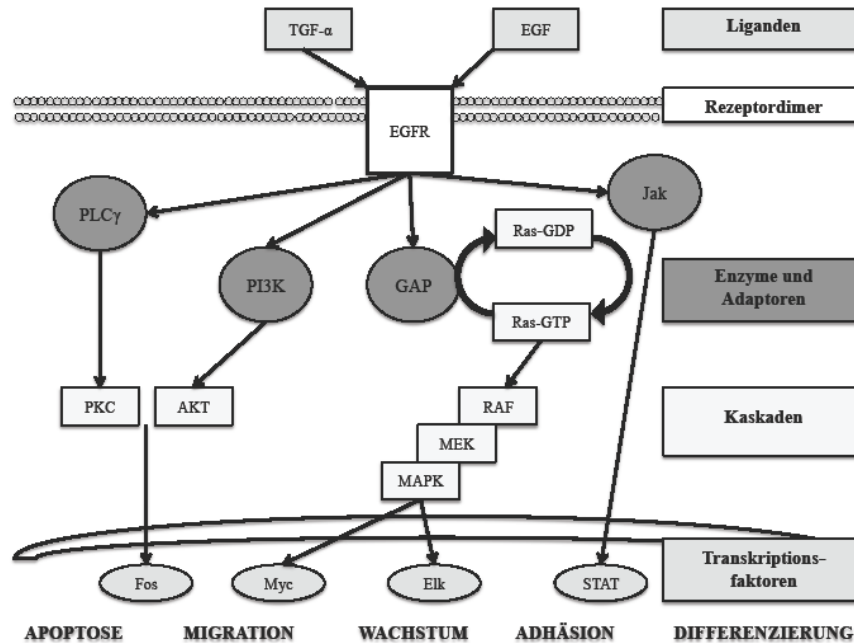


Abbildung 3: Schematische Darstellung der EGFR-vermittelten Signalwege (modifiziert nach Yarden und Sliwkowski 2001, S. 129)

Ein Signalweg führt über die Ras-Raf-Kaskade zu einer Aktivierung der sog. MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), die wiederum weitere Substrate regulieren, welche die Transkription wachstumsregulierender Proteinen wie Cyclin D, p21^{WAF} oder p27^{KIP} beeinflussen. Weitere mögliche Signalwege laufen über PI3K-AKT und sowie die Januskinase (Jak) und STAT-Proteine (*signal transducers and activators of transcription*).

Ein zusätzliches Adaptermolekül des Rezeptors ist die Phospholipase C γ (PLC γ), deren Aktivierung eine IP₃-vermittelte Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern und Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) bewirkt.

Die unterschiedlichen EGFR-vermittelten Signalwege münden jeweils in der Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren im Zellkern und Beeinflussung wachstumsregulierender Proteine.

Resultat ist die Regulierung einer Vielzahl komplexer zellulärer Prozesse wie Genexpression, Zellteilung und –migration, Proliferation, Angiogenese und Anti-Apoptose.

1.7.2.2 Expression des EGFR und dessen Bedeutung im Rahmen der Kopf-Hals-Tumoren

Neben der Expression auf der Zelloberfläche gesunder Zellen zeigen auch Tumorzellen eine (Über)Expression des EGF-Rezeptors. Dazu gehören vor allem Tumoren epithelialen Ursprungs wie Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs, der Haut und des Oesophagus, aber unter anderem auch Neoplasien von Gehirn, Brust, Lunge, Darm und Prostata (Salomon et al. 1995).

In vielen Fällen scheint eine veränderte Expression des Rezeptors ausschlaggebend für Tumorgenese und Tumorprogress zu sein.

Durch Überexpression von Wachstumsfaktoren, vor allem aber durch Mutationen und Überexpression des EGFR, kann es zu einer erhöhten Aktivität der EGFR-Tyrosinkinase und folglich zu einer Verstärkung der EGFR-vermittelten Signalkaskade kommen. Mögliche Gründe einer gesteigerten EGFR-Expression können unter anderem eine Genamplifikation oder insbesondere Fehlregulationen auf RNA-Ebene sein. Die Überaktivität des EGF-Rezeptors und der generierten Wachstumssignale kann zu einer ligandenunabhängigen Dauerstimulation führen und bedingt ein unkontrolliertes Zellwachstum. Das zelluläre Gleichgewicht verschiebt sich zugunsten von Proliferation, Angiogenese und Metastasierung, während die Apoptose reduziert wird.

Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs zeigt sich in 80-90 % der Fälle eine Rezeptor-Überexpression (Dassonville et al. 1993). Während auf normalen Zellen die EGFR-Expression zwischen 40.000 bis 100.000 Rezeptoren pro Zelle variiert, ist sie bei Tumorzellen des Kopf-Hals-Bereichs zum Teil um das 1,8-1,9fache erhöht (Carpenter und Cohen 1979; Grandis und Tweardy 1993). Diese Überexpression tritt schon früh im Rahmen der Karzinogenese auf, d.h. gesundes peritumoröses Gewebe kann im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe eine Rezeptor-Überexpression aufweisen (Shin et al. 1994). Die Anzahl der überexprimierten Rezeptoren nimmt parallel zum Schweregrad der Dysplasie zu (Grandis et al. 1996).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression des EGFR sowie klinisch-pathologischen Daten und der Prognose von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren wird nach wie vor kontrovers diskutiert.

Unterschiedliche Arbeitsgruppen postulierten einen Zusammenhang zwischen der Expression des EGFR und einem fortgeschrittenem Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen, einem kürzeren rezidivfreien Überleben und kürzerem Gesamtüberleben (Ang et al. 2002; Dassonville et al. 1993; Grandis et al. 1998; Maurizi et al. 1996).

Eine Bestrahlung der Tumorzellen im Rahmen der Therapie führte zu einer Aktivierung des EGFR und zu einer gesteigerten Expression des Rezeptors (Schmidt-Ullrich et al. 1994). Das Endresultat, die Vermittlung der Zellproliferation, gleicht der ligandenabhängigen Aktivierung des Rezeptors (Bowers et al. 2001). Dennoch konnte eine mögliche Rolle der quantitativen EGFR-Expression als prognostischer Faktor bei Kopf-Hals-Tumoren für das Ansprechen einer Radio(chemo)therapie bislang nicht endgültig nachgewiesen werden (Aebersold et al. 2002; Dassonville et al. 1993; Magné et al. 2001).

1.7.3 Natrium/Glukose-Cotransporter SGLT1

1.7.3.1 Struktur und Funktion

Essentieller Bestandteil zur Bereitstellung von Energie im menschlichen Organismus ist die Aufnahme und Verarbeitung von Glukose. Die Glukoseaufnahme der Zellen wird durch zwei unterschiedliche Mechanismen vermittelt. Zum einen durch die Glukosetransportproteine (GLUT) der SLC2-Genfamilie, die einen erleichterten, energieunabhängigen Transport von Glukose und strukturell ähnlichen Proteinen entlang des Konzentrationsgefälles vermitteln.

Auf der anderen Seite ermöglichen sog. Natrium/Glukose-Co-Transporter (*sodium-glucose transporter*, SGLT- oder SLC5-Genfamilie) einen aktiven Transport.

Mitglieder der SLC5-Cotransporterfamilie beinhalten Transporter unter anderem für Zuckermoleküle, Myo-Inositol, Anionen, Fettsäuren und Cholin (Wright et al. 2011). Beim Menschen sind bislang sechs unterschiedliche Transporter identifiziert (SGLT1-6), die sich anhand ihrer Substrate und Gewebespezifität unterscheiden, sich jedoch strukturell ähneln.

Tabelle 24 und Tabelle 25 im Anhang zeigen die wichtigsten Vertreter beider Genfamilien.

Seit Aufstellung der Hypothese zum aktiven, natriumabhängigen Transport von Glukose im Jahre 1960 durch Robert Crane gilt der SGLT1 als Prototyp des ionengekoppelten Co-Transports (Crane 1960).

Nachdem 1987 ebendieses aktive Transportprotein aus dem Dünndarm von Kaninchen kloniert wurde, gelang Hedinger, Turk und Wright zwei Jahre später die Klonierung aus dem menschlichen Dünndarm (Hediger et al. 1989).

Die Primärstruktur des menschlichen Proteins besteht aus 664 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 73 kDa (Turk et al. 1994).

Laut dem allgemein anerkannten Topologiemodell von Ernest M. Wright wird die Sekundärstruktur des Proteins aus 14 transmembranären α -Helices gebildet, die NH_2 -Domäne und der hydrophobe COOH -Terminus sind extrazellulär lokalisiert (Wright et al. 2011). Die Bindung der Zuckermoleküle erfolgt am COOH -Terminus unter der Beteiligung der Transmembrandomänen 11 bis 14 (Panayotova-Heiermann et al. 1997).

Die Tertiärstruktur wird nach wie vor diskutiert. Durch Tiermodelle gewonnene Erkenntnisse implizieren, dass es sich um ein Homotetramer handelt (Wright et al. 2011).

Unter physiologischen Bedingungen wird der SGLT1 nach der Nahrungsaufnahme auf der apikalen Bürstensaummembran reifer Enterozyten exprimiert. Dort vermittelt er mit gleich hoher Affinität, aber verhältnismäßig niedriger Kapazität, die Aufnahme von D-Glukose und Galaktose aus der Nahrung (Wright et al. 2011). Zusätzlich wird der Co-Transporter auch im S3-Segment des proximalen Tubulus der Niere exprimiert und ermöglicht dort die Re-Absorption von Glukose (Takata 1996). Der Transport der Zuckermoleküle ist sekundär aktiv und verläuft unter Verbrauch von Energie gegen einen Konzentrationsgradienten, er weist eine Michaelis-Menten-Kinetik auf.

Die für den Transport benötigte Energie erhält der Transporter über den Konzentrationsgradienten der Natriumionen (Na^+) zwischen Intra- und Extrazellulärraum und das negative Membranpotential. Eine an der basolateralen Membran lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase sorgt unter Hydrolyse von ATP für die Aufrechterhaltung des Natriumgradientens (vgl. Abbildung 4).

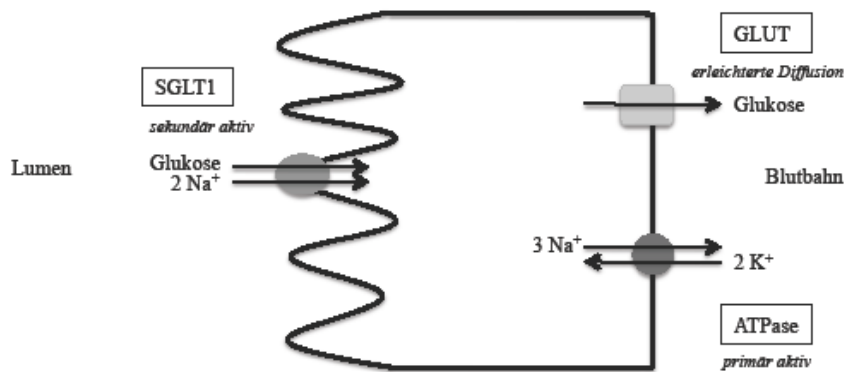


Abbildung 4: Zelluläre Lokalisation der Glukosetransporter (modifiziert nach Wright et al. 2007, S. 33)

Pro Glukosemolekül werden zwei Natrium-Ionen in das Zellinnere transportiert. Die Bindung von Natriumionen an das N-terminale Segment des Co-Transporters löst eine Affinitätssteigerung an der Bindungsstelle für Monosaccharide aus (Hirayama et al. 2007). Die Bindung von Monosacchariden wiederum sorgt über eine Konformationsänderung für den Transport in die Zelle (Panayotova-Heiermann et al. 1996). Die Natriumionen folgen nach der Dissoziation der Glukosemoleküle in das Zytoplasma. Um den Rücktransport zu verhindern, nimmt der Transport anschließend wieder seine ursprüngliche, inaktive Konformation an (Wright und Turk 2004).

1.7.3.2 Expression des SGLT1 und dessen Bedeutung im Rahmen der Kopf-Hals-Tumoren

Tumorzellen lassen sich unter anderem durch einen veränderten Glukosestoffwechsel charakterisieren. Bei gestörtem, oxidativem Katabolismus erfolgt der Abbau verstärkt via anaerober Glykolyse unter der Bildung von Laktat (Ganapathy et al. 2009; Warburg 1956). Der gesteigerte Bedarf an Glukose wird unter anderem über die Induktion von Glukose-Transportern sichergestellt (Flier et al. 1987). Eine gesteigerte Expression der Transportproteine für den erleichterten Glukosetransport, insbesondere von GLUT1, wurde bereits bei unterschiedlichen Tumorentitäten nachgewiesen (Barron et al. 2012; Yamamoto et al. 1990).

Im Gegensatz dazu liefert die Literatur bislang nur vereinzelt Studien zur Expression des SGLT1 im Rahmen maligner Prozesse.

Blais beschrieb einen natriumabhängigen Glukose-Transporter in differenzierten ICH -29 Zellen, dessen in vitro-Expression sich durch das Vorhandensein von Glukose beeinflussbar zeigte (Blais 1991). Mittels Western Blot gelang der Proteinnachweis in der Bürstensaummembran der Kolonkarzinomzellen Caco-2 (Bissonnette et al. 1996). Kipp et al. konnten diese Lokalisation weiter präzisieren, indem sie beschrieben, dass der Transporter in kultivierten Caco-2-Zellen sowohl intrazellulär (verbunden mit Mikrotubuli), als auch apikal (in einem Verhältnis von 2:1) nachweisbar ist (Kipp et al. 2003).

Bei Lungenkarzinomen konnte mittels Real-time-Polymerasekettenreaktion kein Unterschied zwischen der SGLT1-Expression in Primärtumor, Metastasen und Normalgewebe gefunden werden (Ishikawa et al. 2001).

Anhalt für eine differenzierungsabhängige Expression des SGLT1 in normaler und präneoplastischer Mukosa sowie bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs fand die Arbeitsgruppe um Helmke (Helmke et al. 2004). SGLT1-mRNA konnte hauptsächlich in Zellkulturen mäßig bis gut differenzierter Plattenepithelkarzinome nachgewiesen werden. Auf Proteinebene zeigte sich auch in gesunder Mukosa eine positive SGLT1-Färbung, allerdings begrenzt auf differenzierte Geweberegionen unter Aussparung dysplastischer Areale. Analog dazu war die SGLT1-Expression im Tumorgewebe heterogen und auf differenzierte Tumorzellen begrenzt.

Eine ähnliche, differenzierungsabhängige Expression des SGLT1 fanden auch Deron et al. in ihrer Studie zur Expression und prognostischen Aussage von Glukose-Transportern bei Plattenepithelkarzinomen der Tonsillen und Zunge (Deron et al. 2011). Die Expression war bei Karzinomen der Tonsille signifikant höher als bei Zungenkarzinomen, jedoch konnte keine signifikante prognostische Rolle für SGLT1 bei diesen beiden Tumorentitäten nachgewiesen werden.

Ausgangspunkt weiterer Forschungen zu der Expression des SGLT1 ist eine Studie von Weihua et al. aus dem Jahr 2008, die eine interessante Rolle des Transporters im Zusammenhang mit dem EGFR bei Tumorzellen epithelialen Ursprungs offenlegte (Weihua et al. 2008). Die Autoren demonstrierten eine Interaktion beider Proteine, die über die extrazelluläre Domäne des EGFR vermittelt wird und unabhängig von der Tyrosinkinasefunktion erfolgt. Diese Stabilisierung des SGLT1 gewährleistete

die Glukoseaufnahme der Tumorzellen und verhinderte somit den Zelltod. Eine Downregulation des EGFR führte zu einer verminderten SGLT1-Expression und niedrigeren Glukosekonzentrationen.

Darauf aufbauend untersuchten Hanabata et al. eine mögliche Co-Expression beider Proteine in Bezug auf die Differenzierung bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (Hanabata et al. 2011). Es zeigte sich, dass eine hohe Expression des EGFR auch mit einer höheren Expression des SGLT1 verbunden war und diese Co-Expression möglicherweise für die De-Differenzierung dieser Tumorentität benötigt wird.

Bislang liegen verhältnismäßig wenig klinische Daten über eine mögliche Beteiligung des SGLT1 an malignen Prozessen vor.

In einer Studie, welche die Expression des SGLT-1 (p53 und Bcl-2) bei Adenokarzinomen des Pankreas immunhistochemisch untersuchte, fanden die Autoren einen statistischen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen der Überexpression des SGLT1 und dem krankheitsfreien Überleben (Casneuf et al. 2008).

Bei kolorektalen Karzinomen konnten Guo et al. eine positive Korrelation zwischen der Expression von SGLT1 und dem klinischen Stadium nachweisen (Guo et al. 2011). Außerdem zeigte sich ein Trend für eine positive Korrelation zwischen der SGLT1-Expression und dem Ansprechen einer first-line Chemotherapie, wohingegen sich kein Zusammenhang zwischen der Expression des SGLT1 und dem krankheitsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben feststellen ließ.

1.8 Zielsetzung

Die konkominante, primäre Radiochemotherapie ist momentan Therapie der Wahl zur Behandlung inoperabler, lokal fortgeschrittener Kopf-Hals-Tumoren. Dabei stellt insbesondere die lokoregionäre Kontrolle eine therapeutische Herausforderung dar, da ein Großteil der lokoregionären Rezidive innerhalb der ersten zwei Jahre nach Behandlung auftritt (Argiris et al. 2008).

Die Tumoren zeigen die Eigenschaft, mit unterschiedlicher Strahlensensibilität auf die Therapie zu reagieren. Während einige Patienten nach Abschluss der Therapie eine komplette Rückbildung der Tumormasse aufweisen, zeigt sich bei anderen nur eine partielle Remission. In einigen Fällen kommt es unter Therapie sogar zum Tumorprogress.

Ähnlich verhält es sich mit der Reaktion des „Normalgewebes“ auf die Radio(chemo)therapie. Im Gegensatz zu Patienten, welche die Behandlung ohne Entwicklung von Nebenwirkungen tolerieren, kommt es bei anderen zum Auftreten starker, zum Teil auch therapielimitierender Nebenwirkungen.

Die Rolle von molekularen Biomarkern bei der Entwicklung von Nebenwirkungen unter einer Radio(chemo)therapie bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren wurde bislang nicht geklärt.

Idealerweise ließen sich durch eine prätherapeutische Evaluation der Expression definierter molekularer Gewebemarker Aussagen zu der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Nebenwirkungen unter einer primären Radio(chemo)therapie und dem Outcome dieser Behandlung treffen und eine individualisierte Anpassung von z.B. Dosis und Dauer dieses Therapieregimes ermöglichen.

Die Expression des EGFR und insbesondere p53 ist im Rahmen von Kopf-Hals-Tumoren intensiv beschrieben worden. Als wichtige Kontrollinstanz des Zellzyklus und Transkriptionsfaktor wird p53 eine entscheidende Rolle im Rahmen der Tumorbilogie zugeschrieben. Mittlerweile hat sich auch die Relevanz von EGFR-vermittelten Signalkaskaden sowohl bezüglich tumorbiologischer Mechanismen als auch als therapeutisches Target im klinischen Alltag etabliert.

Zu der Expression des aktiven Na⁺/Glukose-Symporters SGLT1 im Rahmen von malignen Prozessen liefert die Literatur bislang vergleichsweise wenig Informationen. Bisherige Daten implizieren jedoch, dass der Co-Transporter, gerade in Verbindung mit dem EGFR, eine wichtige Rolle im Rahmen des Tumorzellmetabolismus spielt (Weihua et al. 2008).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression der molekularen Marker p53, EGFR und SGLT1 und den Nebenwirkungen sowie dem Outcome einer primären Radio(chemo)therapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren zu identifizieren. Dazu sollte ein Patientenkollektiv von insgesamt 233 Patienten retrospektiv analysiert werden. Alle Patienten wurden im Zeitraum zwischen 1994 und 2011 aufgrund eines lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereichs in der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Göttingen therapiert. Die im Rahmen der Diagnostik asservierten Tumorbiopsien werden auf die Expression von p53, EGFR und SGLT1 immunhistochemisch untersucht.

In der statistischen Analyse werden zum einen die lokoregionäre Kontrolle und das Gesamtüberleben des Patientenkollektivs berechnet, zum anderen das Auftreten von Akut- und Spätnebenwirkungen ausgewertet und im Zusammenhang mit der Expression der molekularen Marker betrachtet.

2 Patienten, Probenakquirierung, Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus 233 Patienten, welche im Zeitraum von 1994 bis 2011 aufgrund eines Tumors im Kopf-Hals-Bereich in der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) behandelt wurden.

Als Einschlusskriterium wurde die Behandlung in Form einer primären Radio(chemo)therapie in kurativer Intention bei histologisch gesichertem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx oder des Larynx ohne Fernmetastasierung definiert. Die Möglichkeit einer Resektion in kurativer Absicht war vorab durch Ärzte der HNO-Abteilung ausgeschlossen worden. Mögliche Gründe einer Inoperabilität waren unter anderem ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit Infiltration umgebender Strukturen (z.B. der Arteria carotis) bzw. allgemeine Kontraindikationen gegen ein operatives Vorgehen unter Vollnarkose z.B. bei internistischen Begleiterkrankungen.

Patienten mit anderen Tumorentitäten des Kopf-Hals-Bereichs, wie Nasopharynxkarzinomen, wurden aufgrund von Unterschieden unter anderem bezüglich Epidemiologie, Klinik und Therapie primär ausgeschlossen.

Patienten, die außerhalb der UMG bestrahlt wurden und bei denen daher kein Follow up möglich war, wurden aus dieser Arbeit ausgeschlossen.

Bezogen auf Alter, Geschlecht oder Risikofaktoren wurden keine Ausschlusskriterien festgelegt. Die Altersverteilung lag zwischen 21 und 89 Jahren (Durchschnitt: 60 Jahre).

197 der eingeschlossenen Patienten waren männlich, 36 waren weiblich.

17 Patienten waren Nichtraucher. 199 Patienten gaben an zu rauchen bzw. geraucht zu haben. Bei 17 Patienten war keine Information bezüglich eines möglichen Nikotinkonsums vorhanden.

Den Konsum von Alkohol beschrieben 173 Patienten (43 Patienten verneinten Alkoholkonsum, bei 17 Patienten lag keine Information vor). Von den 173 Patienten konsumierten 28 Patienten gelegentlich Alkohol, 114 Patienten regelmäßig, 31 Patienten gaben eine Abstinenz bei früherem Alkoholkonsum an.

Bei insgesamt 166 Patienten lag anamnestisch ein kombinierter Nikotin- und Alkoholkonsum vor.

63 Patienten zeigten einen Primärtumor im Bereich der Mundhöhle. Bei 99 Patienten war der Primarius im Bereich des Oropharynx lokalisiert, bei 45 Patienten im Bereich des Hypopharynx. Einen Ersttumor im Bereich des Larynx zeigten 26 Patienten.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wurde bei 7 Patienten ein Tumor im Stadium T1 festgestellt, bei 17 Patienten ein Stadium T2, bei 39 Patienten ein Stadium T3 und 170 der Tumore waren im Stadium T4.

Bei 35 Patienten wurde im Rahmen des Stagings kein Befall der Lymphknoten gefunden (N0). 27 Patienten wiesen ein N1-Stadium auf. Insgesamt 149 Patienten zeigten ein N2-Stadium und 22 ein N3-Stadium.

Alle Karzinome wurden histologisch als Plattenepithelkarzinome beschrieben. 11 waren gut differenzierte Karzinome (G1), 187 waren mäßig differenziert (G2) und 35 waren schlecht differenziert (G3).

Gemäß UICC-Klassifikation befanden sich 7 Patienten im UICC-Stadium II und 16 Patienten im UICC-Stadium III. Insgesamt 210 Patienten wurden als UICC-Stadium IV eingestuft, davon 189 als UICC IVa und 21 Patienten als UICC IVb.

Tabelle 26 im Anhang fasst die Charakteristika des untersuchten Patientenkollektivs zusammen.

2.2 Therapie des Primärtumors

Das gesamte Patientenkollektiv wurde mittels primärer Radiotherapie behandelt.

Gemäß den aktuellen Leitlinien werden Tumore der UICC-Stadien I und II primär operiert. In diese Studie eingeschlossen wurden jedoch auch sieben Patienten in UICC-Stadium II, die primär radio(chemo)therapiert wurden.

Bei sechs dieser insgesamt sieben Patienten handelte es sich bei dem zu behandelnden Tumor um ein lokoregionäres Rezidiv. In diesen Fällen wurde auf ausdrücklichen Wunsch der Patienten keine operative Resektion durchgeführt. Bei einem Patienten bestanden aufgrund multipler Begleiterkrankungen Kontraindikationen für eine operative Therapie.

Innerhalb des untersuchten Zeitraumes kamen, zum Teil überlappend, unterschiedliche Bestrahlungstechniken und Chemotherapeutika zum Einsatz.

Von Juni 1994 bis September 2010 wurden insgesamt 138 Patienten 3D-konformal bestrahlt.

Diese Patienten wurden nach einem normofraktionierten Radiotherapieschema fünfmal wöchentlich mit einer Strahlendosis von 2 Gy pro Fraktion behandelt. Aufbauend auf eine dreidimensionale CT-basierte Planung wurde zunächst der Primärtumor sowie die zervikalen und supraclaviculären Lymphabflussgebiete beidseits mit einer Dosis von 50 Gy bestrahlt. Die Gesamtdosis von 70 Gy wurde anschließend durch einen Boost von 20 Gy (2 Gy pro Fraktion, fünfmal wöchentlich) auf Primärtumor und makroskopisch befallene Lymphknoten aufgesättigt. Die Maximaldosis für das Rückenmark betrug insgesamt 45 Gy.

Bei 45 Patienten erfolgte die Therapie von September 1999 bis Februar 2008 in einer lateral opponierenden „Kreuzfeuerbestrahlung“. In der ersten Etappe wurde der Primärtumor sowie die oberen Halslymphknoten über zwei lateral opponierende Photonenfelder mit 2 Gy pro Fraktion bis zu einer Dosis von 36 Gy bestrahlt. Anschließend wurde das Rückenmark geblockt und die hinteren Halslymphknoten mit Elektronen in individueller Energie je nach benötigter Eindringtiefe aufgesättigt. Die unteren Halslymphknoten sowie supraclaviculäre Lymphknotenstationen wurden jeweils über ein ventrales Feld mit 3 cm Herdtiefe abgedeckt.

Nach Erreichen einer Dosis von 50 Gy im Bereich des Primärtumors und der (supra)claviculären Lymphknoten erfolgte ein Boost (2 Gy pro Tag an 5 Tagen pro Woche bis zu 20 Gy) bis zum Erreichen einer Gesamtdosis von 70 Gy. Die Planung dieser Boostapplikation erfolgte CT-basiert. Das Rückenmark wurde mit einer Gesamtdosis von 45 Gy bestrahlt.

Insgesamt 34 Patienten wurden von Juli 2008 bis April 2011 per intensitätsmodulierter Radiotherapie (IMRT) bestrahlt, bei 16 Patienten erfolgte die Bestrahlung ab November 2009 bis September 2011 mit einer intensitätsmodulierten Rotationstechnik (RapidArc). Bei beiden Techniken wurden Einzeldosen von 2,2 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 66 Gy appliziert.

170 Patienten wurden begleitend chemotherapeutisch behandelt: in Form von fünf Einzelgaben erhielten 93 Patienten kontinuierliche, intravenöse (i.v.) Infusionen mit 5-FU (600 mg/m^2 Körperoberfläche an den Tagen 1 bis 5 der Radiotherapie) in Kombination mit zwei Mitomycin-Gaben (10 mg/m^2 Körperoberfläche an Tag 5 und 36 der Bestrahlung), ein Patient wurde ausschließlich mit Mitomycin

chemotherapeutisch behandelt. 67 Patienten wurden nach einem platinbasierten Chemotherapieschema behandelt: ein Patient mit Carboplatin (50 mg/m² Körperoberfläche i.v. vor jeder Bestrahlungsfraction), 66 Patienten mit Cisplatin, in einer Dosierung von bis zu 6 mg/m² Körperoberfläche i.v. an jedem Bestrahlungstag. 9 Patienten erhielten aufgrund einer reduzierten Kreatinin-Clearance (≤ 60 ml/min) anstatt einer platinbasierten Chemotherapie begleitend zur Radiotherapie den EGFR-Antikörper Cetuximab als sogenannte *loading dose* 400 mg/m² Körperoberfläche eine Woche vor Beginn der Radiotherapie und anschließend wöchentlich 250 mg/m² Körperoberfläche begleitend zur Bestrahlung.

2.3 Dokumentation der Toxizität und Follow-up

Im Vorfeld der statistischen Datenanalyse wurden Nebenwirkungen mit CTCAE ≥ 3 als höhergradige Toxizität und cut off-Wert definiert, da ab Nebenwirkungen dieses Grades mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität der Patienten zu rechnen ist. Während der Therapie wurde die Akuttoxizität anhand der CTCAE-Kriterien wöchentlich erfasst und in der Patientenakte dokumentiert. Nach Abschluss der Behandlung erfolgte die Dokumentation bis zum Abklingen der Akutnebenwirkungen im zweiwöchentlichen Intervall.

Im Rahmen der Nachsorge erfolgte die Evaluation und Dokumentation der radiogenen Spätschäden anhand der Lent-SOMA Kriterien.

Zur Beurteilung einer Remission erfolgte drei Monate nach Behandlungsende eine klinische HNO-Untersuchung mit Palpation der Lymphknotenstationen an Kopf und Hals sowie eine computertomographische Bildgebung des Kopf-Hals-Bereichs. Eine Komplettremission wurde als fehlendes Vorhandensein aller makroskopischen Tumormanifestationen definiert. Über einen Zeitraum von zwei Jahren folgten im dreimonatlichen Intervall HNO-ärztliche Kontrollen sowie – bei Verdacht auf ein lokoregionäres Rezidiv, Fernmetastasen oder Zweittumoren – zusätzlich entsprechende bildgebende Diagnostik. Suspekte Befunde wurden bioptisch abgeklärt.

Die Nachsorgeuntersuchungen wurden bei Rezidivfreiheit bzw. fehlender Metastasierung zwei Jahre nach Therapieende auf halbjährliche bzw. jährliche Kontrollen erweitert.

2.4 Probenakquirierung

Vor Therapiebeginn wurde bei allen Patienten eine ausführliche Anamnese erhoben. Im Rahmen der Diagnostik erfolgte eine HNO-Untersuchung inklusive Panendoskopie mit Biopsie sowie eine klinische Untersuchung samt Bildgebung. Außerdem wurden Blutproben zur Bestimmung des Blutbildes und der Leber- und Nierenparameter entnommen sowie ein Elektrokardiogramm durchgeführt.

Die entnommenen Gewebeprobe n wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden die Gewebelö cke in der Abteilung der Pathologie des UMG beurteilt und asserviert.

Das Studiendesign wurde durch eine Ethikkommission begutachtet und bewilligt (Antragsnummer DOK_74_2012).

2.5 Material

2.5.1 Chemikalien und Antikörper

Tabelle 1: Chemikalien und Antikörper

Chemikalien:		
Albumin fraction Art.-Nr. 1.12018.0025	Merck	Darmstadt, Deutschland
Antibody Diluent ZUC025-500	Zytomed Systems GmbH	Berlin, Deutschland
Aqua dest.	Universität Göttingen	Göttingen, Deutschland
Hämalaun (nach Mayer)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat Art.-Nr. 1.00244.1000	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Chemie Vertrieb GmbH&Co	Hannover, Deutschland
Natriumchlorid Art.-Nr. 1.06404.1000	Merck	Darmstadt, Deutschland
Protease Proteinase, bacterial Art.-Nr. P8038-16	Sigma-Aldrich	Seelze, Deutschland
Salzsäure 3,5 mol/l Art.-Nr. 1.13134.9010	Merck	Darmstadt, Deutschland
tri-Natriumcitrat-Dihydrat Art.-Nr. 1.06448.0500	Merck	Darmstadt, Deutschland
TRIS Puffer Art.-Nr. 4855.2	Roth	Karlsruhe, Deutschland
VE-Wasser	Universität Göttingen	Göttingen, Deutschland
Xylol	Baker	Deventer, Holland
<u>Antikörperliste:</u>		
p53 (Clone DO-7), Monoclonal Mouse IgG	Biologo	Kronshagen, Deutschland
EGFR (Clone 31G7), Monoclonal Mouse IgG	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland

SGLT1 [N3C3], Polyclonal Rabbit AK Katalog-Nr.: GTX105367	GeneTex Inc.	Irvine, USA
---	--------------	-------------

2.5.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

BSA 2 %	4g Albumin Fraction 200 ml TRIS-Puffer
Citratpuffer pH 6,0	18 ml Lösung A: 4,2 g Citronensäure-Monohydrat 200 ml VE-Wasser 82 ml Lösung B: 29,4 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat 1 l VE-Wasser
Chromogen-Substrat-Arbeitslösung	1 Trpf. Levamisole für je 10 ml AP Substrat Puffer ; 750 µl AP-Substratpuffer (mit Levamisole) 30 µl Chromogen Red 1 30 µl Chromogen Red 2 30 µl Chromogen Red 3
TBS-Puffer pH 7,4	900 ml VE-Wasser plus 100 ml Konzentrat: 60,6 g TRIS 87,6 g Natriumchlorid 800 ml VE-Wasser 120 ml Salzsäure 3,5 mol/l

2.5.3 Laborkits

Tabelle 3: Laborkits

Detektions-Kit Dako Real K5005	DakoCytomation	Hamburg
Bestehend aus:		
<ul style="list-style-type: none"> • Biotylinierter Sekundär-Antikörper (Ziege-Anti-Maus) 		
<ul style="list-style-type: none"> • Streptavidin-AP-Konjugat 		
<ul style="list-style-type: none"> • Chromogen Red 1-3 		
<ul style="list-style-type: none"> • AP-Substratpuffer 		
<ul style="list-style-type: none"> • Levamisole 		

2.5.4 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Dampfgarer Braun Multigourmet	Braun GmbH	Kronberg, Deutschland
Folieneindeckautomat	Sakura Finetek Germany GmbH	Staufen, Deutschland
Färbeautomat MOZAIC™ MSP 9500 Zymed	Zymed Laboratories Inc.	San Jose, USA
Kühlplatte TES 4004	pfm medical AG	Köln, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland
Schlittenmikrotom Microm HM 430	Microm International GmbH	Waldorff, Deutschland

Wärmebad	Chicago surgical and Electrical co.	Illinois, USA
Wärmeschrank Heraeus®	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA

2.5.5 Zubehör

Tabelle 5: Zubehör

Einmalklingen Feather® A35	Feather Safety Road Co., LTD.	Osaka, Japan
Coverplates	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Klingenhalter	pfm medical AG	Köln, Deutschland
Küvetten	Schütt-Biotec GmbH	Göttingen, Deutschland
Labormarker Art.-Nr. 6130603	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Objektträger Superfrost®plus Art.-Nr. JI800AMNZ	Menzel Gläser GmbH	Braunschweig, Deutschland
Objektträgerbehälter SlideFile™	Simport	Beloeil, Canada
Pinsel	Brunnen	Heilbronn, Deutschland
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.5.6 Software

Tabelle 6: Software

EndNote X5	Thomson Reuters	New York, USA
Excel Mac 2008, Version 12.1.0	Microsoft	Redmond, USA
Word Mac 2008, Version 12.1.0	Microsoft	Redmond, USA
Statistica	StatSoft Europe GmbH	Hamburg, Deutschland

2.6 Methoden

2.6.1 Schnittpräparation

Die Paraffinblöcke wurden zur besseren Schnittgewinnung auf einer Kühlplatte bei -14 °C für mindestens 15 Minuten (min) gekühlt. Danach wurden serielle Schnitte mit einer Dicke von jeweils 2 µm mithilfe eines Schlittenmikrotoms von den Blöcken angefertigt. Fertige Schnitte wurden zeitgleich in einem mit Aqua destillata (Aqua dest.) gefüllten Wasserbad bei Zimmertemperatur feucht gehalten. Die Schnitte wurden dann in ein auf 48 °C erwärmtes Wasserbad mit Aqua dest. Überführt, wo sie sich auf der Wasseroberfläche glätteten, um anschließend auf Objektträgern positioniert zu werden.

Zur Trocknung wurden die Objektträger über Nacht bei 37,5 °C in einem Wärmeschrank deponiert. Danach wurden sie bis zur Färbung trocken und staubgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

2.6.2 Entparaffinierung

Die Entfernung des Einbettmediums erfolgte manuell in insgesamt sieben Arbeitsschritten. Die Schnitte wurden konsekutiv in insgesamt drei Küvetten Xylol für jeweils fünf Minuten entparaffiniert.

Das Rehydrieren der Schnitte erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe.

3x100 % Ethanol

1x96 % Ethanol

1x75 % Ethanol

In jeder der aufgeführten Alkoholkonzentrationen wurden die Schnitte für jeweils 1-2 min belassen.

Abschließend wurden die Schnitte für 2-3 min unter fließendem, vollständig entsalztem Wasser (VE-Wasser) gespült, um dann bis zur Weiterbehandlung in Aqua dest. zu verbleiben.

2.6.3 Vorbehandlung

Vorangegangene Schritte der Fixierung, Dehydrierung und Einbettung können zu einer eingeschränkten bzw. aufgehobenen Immunreaktivität vieler Antigene (Ag) führen.

Der Erfolg der Immunhistochemie (ICH) wird neben der Selektivität und Sensitivität des Nachweisverfahrens vor allem durch die Art der Gewebefixierung bestimmt.

Mit Formaldehyd steht ein preiswertes und einfach zu handhabendes Fixierungsmittel zur Verfügung, das die zellulären Strukturen mit geringen Artefakten hervorragend schützt. Mit dieser Fixierung verbunden ist allerdings ein gravierender Nachteil, der durch die Quervernetzung der Proteine, auch Maskierung oder Antigenmaskierung genannt, zu einem Verlust der „Antigenität“ führt, so dass die Epitope nicht mehr mit den entsprechenden Antikörpern reagieren.

Folge dieser „Maskierung“ des Antigens, respektive des Epitops, sind schwache bis fehlende Signale in der Immunmarkierung an formaldehydfixiertem, paraffineingebettetem Material.

Bis in die späten 1980iger war es, abgesehen von wenigen sogenannten formalinresistenten Antigenen, nicht möglich immunhistochemische Methoden auf formalinfixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE, *formalin-fixed paraffin-embedded*) Gewebeschnitte anzuwenden. Man ging damals davon aus, dass die Epitope durch die Fixierung irreversibel denaturiert wären und es nicht zur Ausbildung eines Antigen-Antikörperkomplexes käme (Warnke 1979). Immuntypisierung gelang nur mit der wesentlich aufwendigeren Gefrierschnitt-Technik.

Die Herausforderung für eine optimale Antigenmaskierung, auch *antigen retrieval* (AR) genannt, besteht in dem Aufbrechen der durch die Fixierung verursachten Quervernetzungen und einer Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur der Epitope unter Erhalt der Gewebemorphologie.

In vielen Laboren wird mittlerweile eine Vorbehandlung mit Proteasen wie Pronase, Proteinase K, Dnase, Ficin oder Pepsin nach eigenen Protokollen durchgeführt (Leong 1993; Taylor et al. 1994). Der eigentliche Durchbruch in der Antigenmaskierung wurde durch die Vorbehandlung der Schnitte mit Hitze erzielt, wodurch die Antigenität des Gewebes und die Reproduzierbarkeit der Färbungen wesentlich gesteigert werden konnten (Shi et al. 1991). In Kombination mit geeigneten Puffern (z.B. 0,01 mol/l Citratpuffer (pH 6,0), 0,1 mol/l Tris-HCl (pH 8,0) oder 1 mmol/l EDTA (pH 8,0) und der enzymatischen Verdauung stellt die Hitzebehandlung (Wasserbad, Mikrowellenofen oder Dampfdrucktopf) heute die Vorbehandlung der Wahl dar, wobei die Mechanismen, die dem *antigen retrieval* zugrunde liegen noch nicht vollständig geklärt sind (Leong und Leong 2007). Jedes

Labor ist auf der Suche nach der besten Vorbehandlung, die häufig einen Kompromiss darstellt zwischen einem Verfahren, das optimal für ein einzelnes Antigen ist und ein durchschnittliches Ergebnis für die meisten Antigene liefert (Shi et al. 2011).

2.6.3.1 Vorbehandlung mit Protease

Die Schnitte für die Färbung des EGFR wurden durch Inkubation mit Protease vorbehandelt.

Die Protease wurde im Verhältnis 4,2 mg/10 ml VE-Wasser in einer Küvette aufgelöst. Dabei wurde das VE-Wasser bereits im Vorfeld im Brutschrank auf 40 °C erwärmt.

Die Küvetten wurden mit den Objektträgern bestückt und anschließend für 10 min bei 40 °C im Brutschrank inkubiert. Vor der Immunmarkierung folgte die Spülung der Objektträger über 5 min unter fließendem VE-Wasser.

2.6.3.2 Vorbehandlung durch Erhitzen in Citratpuffer pH 6

Die Schnitte für die p53- und SGLT1-Färbungen wurden durch Erhitzen in Citratpuffer pH 6 vorbehandelt. Der Citratpuffer pH 6 wurde in einer Färbeküvette im Dampfgerar über 15 min auf ca. 95 °C erhitzt. Die zuvor entparaffinierten und in VE-Wasser feucht gehaltenen Schnitte wurden dann über 40 min in der heißen Citratpufferlösung belassen.

Nach abgelaufener Zeit wurden die Behälter mit den Objektträgern für 10 min in einer Schüssel mit Eiswasser abgekühlt und danach mit VE-Wasser gründlich gespült.

2.6.4 Immunhistochemie

2.6.4.1 Allgemeines

Seit der Einführung der Immunfluoreszenztechnik durch A. Coons im Jahr 1941 wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, mit deren Hilfe sich licht-, fluoreszenz-, oder elektronenmikroskopisch qualitative und semiquantitative Aussagen zur Expression, Synthese, Funktion und Abbau von Molekülen und Antigenen machen lassen. Damit hat man ein geeignetes Werkzeug zur Hand um Gewebeherkunft, Malignität, Prognosen und Therapie beurteilen zu können.

Die wichtigsten Instrumente der Immunhistochemie sind die Antikörper und die Visualisierung des durch die Antigen-Antikörper-Reaktion gebildeten Immunkomplexes mithilfe der immunhistochemischen Färbung. Dadurch wird eine wesentlich höhere Selektivität und Sensitivität erreicht, als bei einfachen histochemischen Färbetechniken (Bourne 1997).

Zum Einsatz kommen vor allem Antikörper der Immunklasse G (IgG). Man unterscheidet polyklonale Antikörper (pAK) und monoklonale Antikörper (mAK).

Das zentrale immunologische Dogma besagt, dass jede Plasmazelle (B-Zelle) nur einen, genau definierten Antikörpertyp einer Ig-Klasse und einer Ig-Subklasse produziert, der gegen ein Epitop gerichtet ist. Dieser Antikörper besitzt eine bestimmte Affinitätskonstante und hat bezüglich seiner Komplement- oder Makrophagen-Aktivierung einzigartige biologische Eigenschaften.

Ein Antigen besteht in der Regel aus mehreren Epitopen und aktiviert somit mehrere B-Zellen d.h. zu einem Epitop gehört eine B-Zelle, die sich nach mehreren Teilungen zu einer Plasmazelle ausdifferenziert. Aus jeder B-Zelle wird ein echter Klon. Nach Kontakt mit einem Fremdanigen entstehen im Organismus gewöhnlich polyklonale Antikörper. Der Nachteil solcher polyklonaler Antiseren ist ihre unterschiedliche Zusammensetzung und fehlende Standardisierung. Wegen der Antikörpervielfalt liegt der Anteil, der gegen ein spezifisches Epitop gerichteten Antikörper zwischen einem Prozent und einem Promille. Bis in die Siebzigerjahre waren polyklonale Antikörper, die von einem Plasmazellpool unterschiedlicher Klonität stammen und gegen unterschiedliche Epitope des gleichen Antigens gerichtet sind, das einzige Werkzeug, das in der Diagnostik, Therapie und Forschung zur Verfügung stand.

Monoklonale Antikörper gehören im Gegensatz dazu zu einer genau definierten Immunklasse und Ig-Subklasse mit einer genau beschriebenen Spezifität bezüglich ihrer Affinitätskonstante und ihren biologischen Funktionen.

1975 entwickelten G. Köhler und C. Millstein die sogenannte Hybridom-Technik, die es erlaubt einen Plasmaklon, der einen wohl definierten monoklonalen Antikörper erzeugt, *in vitro* zu kultivieren (Köhler und Milstein 1975). Mit dem Einsatz monoklonaler Antikörper ist die Selektivität in der Immunhistochemie maximal ausgeschöpft.

Die Sensitivität wird durch die Färbemethode erreicht, wobei das Grundprinzip auf der Komplexbindung des gesuchten Antigens mit dem spezifischen Antikörper

basiert, an den ein Marker gekoppelt ist. Dieser Marker dient der Sichtbarmachung des Antigen-Antikörper-Komplexes.

Man unterscheidet die direkte Methode, bei der nur ein gegen das Antigen spezifischer, markierter Antikörper zum Einsatz kommt, von der indirekten Methode, bei der mindestens zwei Antikörper eingesetzt werden, wobei einer der Antikörper Träger eines Markers ist (vgl. Abbildung 5). Während die direkte Methode wegen ihrer geringen Sensitivität und dem Umstand, dass jeder Antikörper mit dem Marker gekoppelt werden muss, heute kaum noch Anwendung findet, eröffnet die indirekte bzw. 2-Schritt-indirekte Methode eine Vielzahl von Möglichkeiten und Variationen; immer mit dem Ziel, die Sensitivität bei einfacher Durchführbarkeit und vertretbaren Kosten zu steigern.

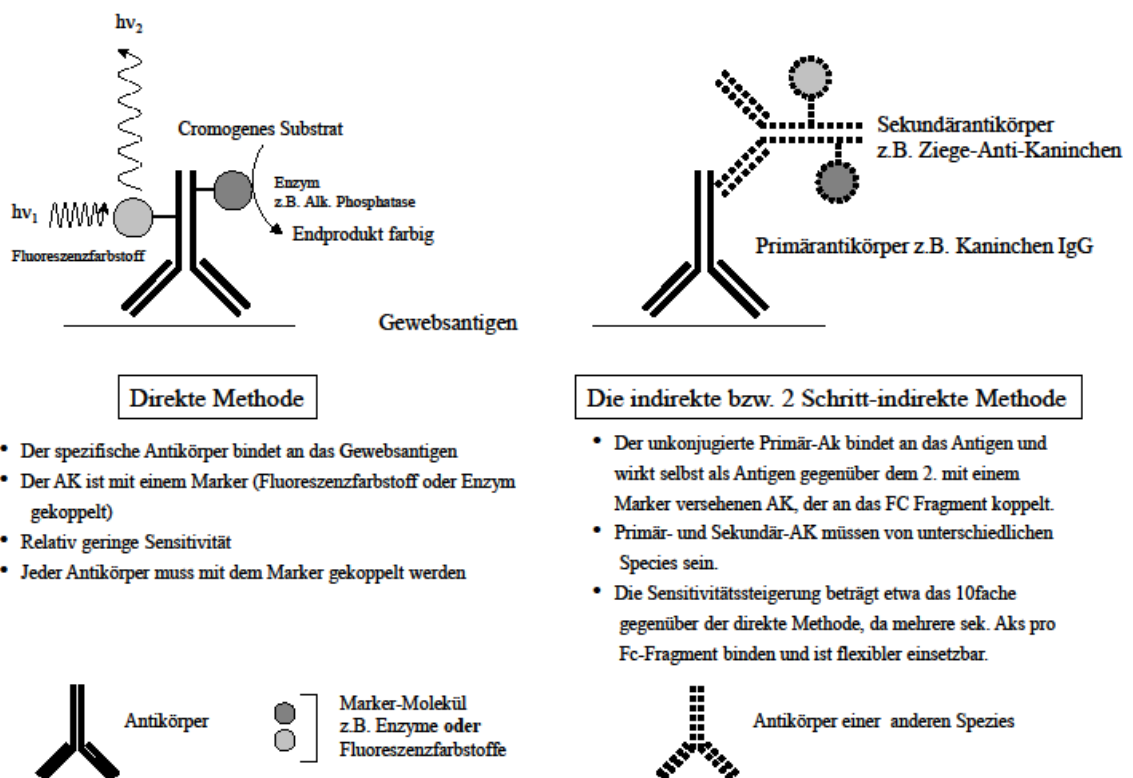


Abbildung 5: Prinzip der Antigenmarkierung bei immunhistochemischen Methoden (modifiziert nach Key 2009, S. 57 - 58)

Wegen ihrer großen Bedeutung, ihrer universellen Einsetzbarkeit und des Umstands, dass diese Methode in meiner Arbeit Anwendung findet, soll hier ausführlicher auf

den Nachweis und die Visualisierung über Sekundärantikörper mithilfe der (Strept-)Avidin-Biotin Methode eingegangen werden.

2.6.4.2 Die (Strept-)Avidin-Biotin-Methode

Man unterscheidet die klassische Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC-Methode) von der „markierten“ (Strept-)Avidin-Biotin-Methode (LSAB, *labeled (strept-)avidin-biotin*-Methode). In Abbildung 6 sind die Hauptcharakteristika beider Methoden graphisch dargestellt.

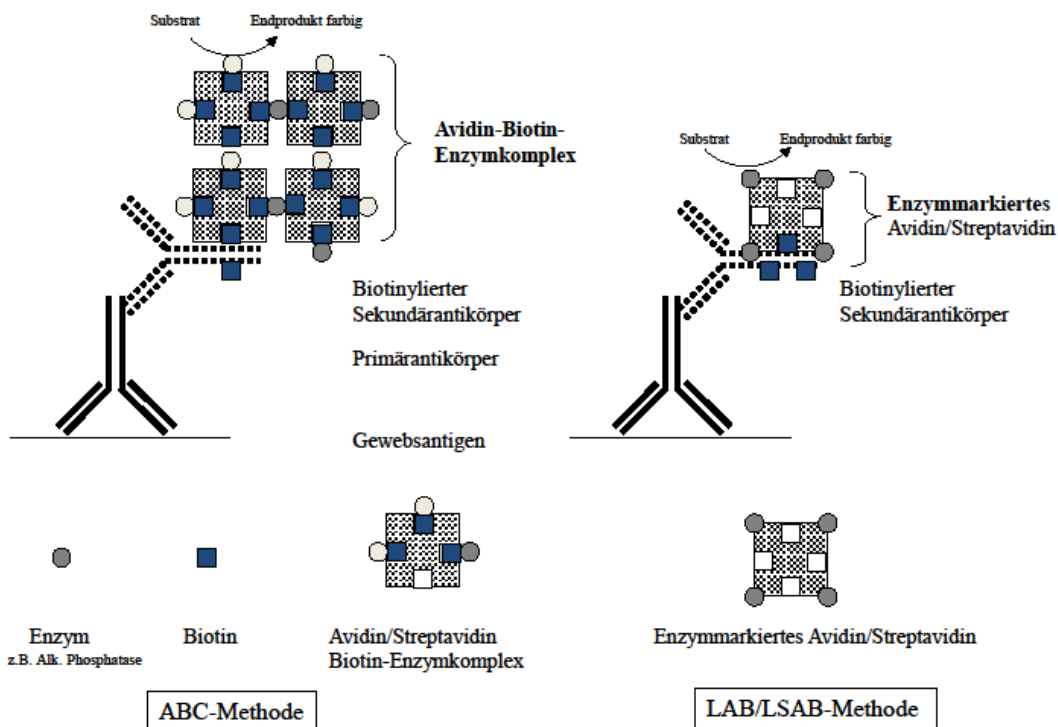


Abbildung 6: Prinzip der ABC- und LSAB-Methode (modifiziert nach Key 2009, S. 58)

Grundlage dieser indirekten 2-Schritt-Methoden ist die sehr starke, nichtkovalente Interaktion des Glykoproteins Avidin mit dem Vitamin Biotin und die damit verbundene, extrem hohe Stabilität des Komplexes, die den Methoden auch den Namen Avidin-Biotin-Methode gaben (Green 1975).

Neben dem Avidin kennt man mit Streptavidin noch ein weiteres Molekül mit einer sehr hohen Affinität zu Biotin. Trotz einer Sequenzhomologie von 30 % zeigen beide Moleküle eine fast identische Sekundär-, Tertiär- und Quartär-Struktur.

Der wesentliche Unterschied liegt darin, dass Avidin als positiv geladenes Glykoprotein mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 10 eine stärkere unspezifische Bindung aufweist als das native Streptavidin. Die Wechselwirkungen mit

biologischen Strukturen lassen sich weiter vermindern, indem man rekombinantes Streptavidin ($pI \approx 7$) und deglykosiliertes Avidin (NeutrAvidin) einsetzt, das in Größe, pI und unspezifischer Bindung mit dem Streptavidin vergleichbar ist (vgl. Tabelle 27 im Anhang).

Die Assoziationskonstante K_a des Streptavidin-Biotin-Komplexes wird in der Literatur mit $2,5 \times 10^{13} \text{ Mol}^{-1}$ angegeben, der Wert für den Avidin-Biotin-Komplex liegt noch darüber. Im Vergleich dazu liegt der Mittelwert der Bindungskonstanten, ausgedrückt als $\lg K_a$ für Ag-Ak-Komplexe bei $8,1 \pm 2,0$ und für Enzym-Substrat-Komplexe bei $3,7 \pm 1,3$ (Houk et al. 2003). Seit der Einführung des Avidin-Biotin-Komplexes in der Immunfluoreszenz durch Hegeness und Ash 1977 sowie durch Guesdon et al. in die immunenzymatische Technik ist er ein universelles, weit verbreitetes Werkzeug in der Bioanalytik (Wilchek und Bayer 1988).

Bei beiden Verfahren, der ABC- sowie der LSAB-Methode, ist der Primärantikörper unkonjugiert, der Sekundärantikörper biotinyliert. Das Biotin ist kovalent an den Antikörper gebunden. Bei der ABC-Methode besteht die dritte Komponente aus einem präformierten, löslichen Komplex aus biotinyliertem Enzym und Avidin. Die Zusammenstellung des Komplexes ist so eingestellt, dass unter den vier Bindungsstellen des Avidins/Streptavidins noch freie Bindungsstellen mit dem Biotin des Sekundärantikörpers eine Bindung eingehen können.

Bei der enzymmarkierten (Strept-)Avidin-Biotin-Methode, LSAB-Methode, ist das Enzym direkt an das Streptavidin gekoppelt und bindet allein an den biotinylierten Sekundärantikörper.

Bei allen Färbungen wurde die LSAB-Methode angewandt. Die LSAB-Methode ist gegenüber der ABC-Methode um den Faktor 4-8 empfindlicher (Giorno 1984). Schon geringe Mengen an Antigenen lassen sich detektieren, das resultierende Signal ist stärker und die verwendeten Antikörpermengen lassen sich reduzieren. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten unerwünschter Hintergrundfärbungen z.B. durch hydrophobe Wechselwirkungen wird durch Zugabe von 2 % Rinderserumalbumin (BSA) reduziert. Zusätzlich wird dadurch endogenes Biotin, das als Vitamin und Coenzym in unterschiedlichen Geweben zu finden ist, vor der Immunmarkierung blockiert.

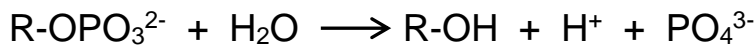
Die Visualisierung des Antigens erfolgt durch die enzymatische Umsetzung des farblosen Chromogens durch das Enzym.

In der vorliegenden Versuchsreihe wurde als Enzym (Label) die Alkalische Phosphatase (AP) eingesetzt.

Neben der Meerrettichperoxidase stellt die Alkalische Phosphatase ein weit verbreitetes Markerenzym dar, das in Verbindung mit einem chromogenen Substrat zur Antikörperfärbung eingesetzt wird.

Wegen der größeren Sensitivität wird die Alkalische Phosphatase der Meerrettichperoxidase als Markierungsenzym vorgezogen, da sie mit ihren chromogenen Substraten sowohl einen höheren Umsatz als auch einen größeren Extinktionskoeffizienten aufweist. Gewonnen wird die AP entweder aus Kälberdarm oder aus Bakterien wie *E. coli*. Die zu den Hydrolasen zählende alkalische Phosphatase (EC-Nummer: 3.1.3.1) ist ein Enzym, das im alkalischen Bereich (pH-Optimum 9,6) die Ester der Orthophosphorsäure mit verschiedenen Alkoholen und Phenolen spaltet.

Allgemeines Reaktionsschema:



Alkalische Phosphatasen kommen in allen Lebewesen vor. Allein beim Menschen findet man 15 Isoenzyme. Wegen der pathophysiologischen Bedeutung kommt der Bestimmung der AP in Körperflüssigkeiten sowie dem Nachweis als hydrolytischem Enzym in Geweben eine große Bedeutung zu.

Als Substrat eignen sich neben p-Nitrophenolphosphaten oder 1-Naphtholphthaleinmonophosphaten vor allem Phosphorsäureester von Derivaten des 3-Hydroxy-2-naphthoesäureanilid (Naphthol AS), insbesondere das 3-Hydroxy-2-naphthoesäure 2,4-dimethylanilid Phosphat (Naphthol AS-MX Phosphat) (vgl. Abbildung 7).

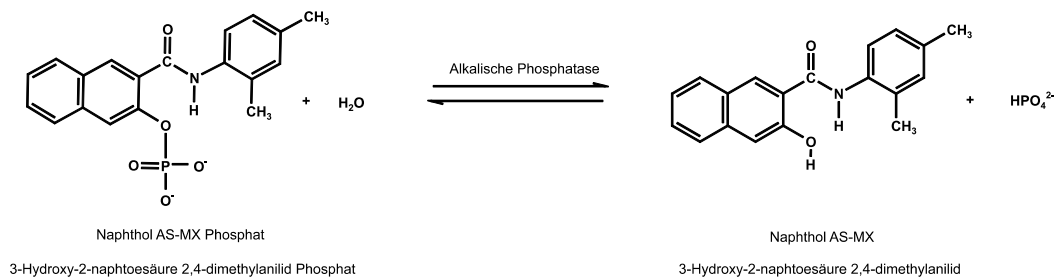


Abbildung 7: Hydrolysereaktion (nach Burstone 1958)

Ziel ist die Bildung eines ortsfesten, schwerlöslichen und farbigen Markers. Nach Hydrolyse mittels AP reagiert das Naphtholderivat mit einem Diazoniumsalz unter

Azokupplung (vgl. Abbildung 8). In Frage kommen Variaminblau-Salze, Echtblau-Salze oder besonders häufig Echröt-Salze wie Fast Red TR (4-Chlor-2-methylbenzendiazonium) oder Fast Red KL (2-Carbamoyl-5-methoxybenzendiazonium). Das Antigen wird via Kopplung mit dem enzymmarkierten Antikörper durch einen roten Farbstoff lokalisiert. Das Absorptionsmaximum liegt bei 505 nm und zeigt nach Grünanregung noch eine Fluoreszenz bei 560 nm. Die entstandene Markierung durch das in dieser Versuchsreihe eingesetzte Fast Red-Chromogen aus dem Dako Detektionskit ist, im Gegensatz zu anderen Fast Red-Produkten, nicht alkohollöslich.

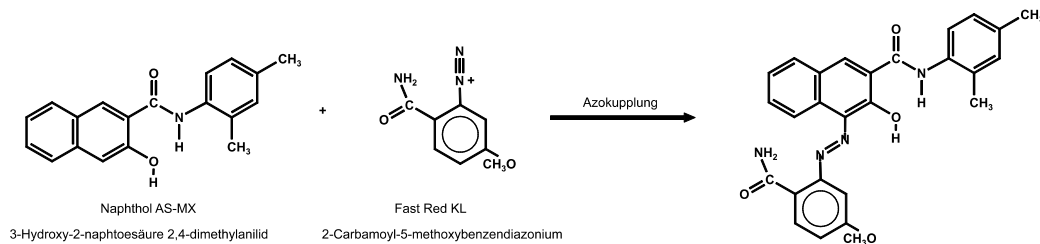


Abbildung 8: Chromogenreaktion (modifiziert nach Espada et al. 1997)

Im letzten Färbeschritt wird dem Substrat das Imidazothiazol Levamisol zugesetzt. Levamisol ist ein Anthelminthikum, das bei immunhistologischen Nachweisen der AP zur Blockung unspezifischer endogener alkalischer Phosphatase nicht aber der im Test eingesetzten intestinalen Phosphatase eingesetzt wird (Cordell et al. 1984). Dadurch wird die Spezifität aufrechterhalten und unspezifische Färbungen reduziert.

2.6.4.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Alle Färbungen wurden maschinell an dem Immunostainer MOZAIK MSP 9500 durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein computergesteuertes, offenes Gerät, das bis zu 96 Objektträger in einem Lauf färbt.

Vor der eigentlichen Immunmarkierung wurden die Schnitte, wie unter 2.6.3 beschrieben, vorbehandelt. Der p53-Primärantikörper wurde unmittelbar vor dem Färbeprozess in einem Verhältnis von 1:75 mit dem Verdünnungsmedium (*antibody diluent*) gründlich durchmischt. Bei dem EGFR-Primärantikörper betrug das Verhältnis zu dem *antibody diluent* 1:50. Der SGLT1-Primärantikörper wurde in einem Verhältnis von 1:200 verdünnt.

Die Pumpe des Gerätes wurde vor der ersten Färbung sowie am Ende des letzten Laufes mit VE-Wasser durchspült. Die Objektträger wurden einzeln auf sog. Coverplates gesteckt. Diese Coverplates ermöglichen ein Kapillarspaltprinzip. Zwischen Objektträger und Coverplate verbleibt ein Spalt von 50 µm Breite, der ein konstantes Volumen von 150 µl hält. Durch Oberflächenspannung wird die definierte Menge Flüssigkeit im Rahmen des Färbeablaufes im Spalt gehalten, überschüssige Flüssigkeit läuft automatisch durch. Die bestückten Coverplates wurden in Gestellen platziert.

Der Färbeablauf wurde an der angeschlossenen Computer-Station programmiert. Dazu wurden nacheinander die Färbeinformationen der einzelnen Objektträger, bestehend aus Primärantikörper, Sekundärantikörper, Tertiärreagenz und Chromogen, eingegeben. Anhand des erstellten Protokolls wurden die Gestelle, bestückt mit den Coverplates, exakt innerhalb der Maschine positioniert. Alle Reagenzien bis auf das Chromogen wurden an den numerisch vorgegebenen Positionen platziert und erneut mit dem Protokoll abgeglichen.

Aufgrund der kurzen Haltbarkeit wurde das Chromogen erst unmittelbar vor Gebrauch während des Label-Auswaschschrittes angesetzt und in der Maschine platziert.

Sämtliche Färbungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Die Mengenangaben (in µl) beziehen sich jeweils auf einen Schnitt/Objektträger.

1. Objektträger unter Wasser zur Vermeidung von Lufteinschlüssen auf Objektträgerhalter (Coverplates) platzieren.

2. Gestelle der Maschine mit gefüllten Coverplates bestücken.
3. 5 min Inkubation mit 150 µl 2 % BSA.
4. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 150 µl des verdünnten Primärantikörpers.
5. Vier Waschdurchgänge mit je 150 µl TBS-Puffer pH 7,4 zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Antikörper aus dem Gewebe.
Bei dem dritten Waschdurchgang 5min Inkubation mit dem Puffer.
6. 20 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 150 µl Link (Sekundärantikörper).
7. Vier Waschdurchgänge mit je 150 µl TBS-Puffer pH 7,4.
Bei dem dritten Waschdurchgang 5 min Inkubation mit dem Puffer.
8. 20 min Inkubation mit 150 µl Label (alkalische Phosphatase-Enzym-Konjugat).
9. 2x10 min Inkubation mit jeweils 100 µl Fast Red/Chromogen-Arbeitslösung.
10. Spülung mit VE-Wasser.
11. 45 s mit 150 µl Hämalan nach Mayer gegenfärben.
12. Objektträger solange in warmem Wasser bläuen, bis das Spülwasser klar ist.
13. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe. Jeweils 30 s in 75 %, 96 %, 100%, 100 % Alkohol.
14. Jeweils 30 s nacheinander in drei Küvetten Xylol.
15. Eindecken mithilfe des Folieneindeckers Sakura.

2.6.5 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte unter einem Lichtmikroskop bei 2- bis 100facher Vergrößerung.

Betrachtet wurden Zellmembran, Zytoplasma und Zellkern der Tumorzellen. Mithilfe eines Punktescores wurde die Färbeintensität der einzelnen Zellkompartimente unabhängig voneinander bewertet.

Vergeben wurden je nach Intensität der angefärbten Tumorzellen 0 bis 3 Punkte:

Keine Färbung	0 Punkte
Schwache Färbeintensität	1 Punkt
Mäßige Färbeintensität	2 Punkte
Starke Färbeintensität	3 Punkte

Der Anteil angefärbter Tumorzellen an den unterschiedlichen Scores wurde prozentual in 5 % Schritten ausgedrückt. Maximal wurden 100 % - entsprechend einer Anfärbung des gesamten Tumors - vergeben. Gesundes Gewebe wurde aus der Wertung ausgeschlossen. Aus der Färbeintensität und dem prozentualen Anteil positiver Tumorzellen wurde ein gewichteter Histologiescore (H-Score) berechnet, indem die Produkte aus Färbeintensität und prozentualem Anteil addiert wurden; so waren für den H-Score Werte zwischen 0 und 300 möglich.

Bezüglich der nukleären p53-Expression wurde ein H-Score ≤ 90 als niedrige Expression und Werte > 190 als hohe Expression gewertet, wobei H-Scores, welche zwischen diesen Werten lagen, als mittlere Expression eingestuft wurden.

Bei der p53-Expression im Zytoplasma lag der Cut-Off-Wert einer niedrigen Expression bei ≤ 50 , hohe Expressionen wurden als H-Score > 105 definiert.

Der H-Score für die Einteilung in eine niedrige nukleäre EGFR-Expression betrug ≤ 0 , als hohe nukleäre Expression wurden H-Score > 10 gewertet.

Bei einem H-Score ≤ 110 erfolgte die Einteilung in eine niedrige zytoplasmatische EGFR-Expression, ab einem H-Score > 170 wurde die EGFR-Konzentration im Zytoplasma als hoch gewertet.

Bezüglich der membranösen EGFR-Expression wurden Werte ≤ 117 als niedrig eingestuft, eine hohe Expression wurde ab einem H-Score > 200 definiert.

Bei der nukleären SGLT-1 Expression lag der Cut-Off für eine niedrige Expression bei ≤ 0 , hohe Expressionen wurden als H-Score > 40 festgelegt.

Der H-Score für die Einteilung als niedrige zytoplasmatische SGLT1-Expression wurde als ≤ 10 definiert, ein H-Score > 90 galt als hohe Expression.

2.6.6 Statistische Auswertung

Für die statistischen Analysen wurde das Programm „Statistica“ (StatSoft Europe GmbH, Hamburg) verwendet. Alle statistischen Test wurden mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ berechnet.

Um Korrelationen zwischen den jeweiligen Expressionsmustern zu ermitteln, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r) ermittelt und in Streudiagrammen graphisch dargestellt.

Für die Untersuchung der unterschiedlichen zellulären Expressionsmuster bezogen auf höhergradiger Nebenwirkungen wurden Lageparameter (Median, Maximum, Minimum, 25 %- und 75 %-Quantil) berechnet. Zu vergleichende Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test in einen statistischen Kontext gesetzt. Die Visualisierung erfolgte mittels Boxplot.

Zur Schätzung des Gesamtüberlebens sowie der lokoregionären Kontrolle wurde die Kaplan-Meier-Methode verwendet. Die Überlebenszeitwahrscheinlichkeit wurde ab dem Tag der histopathologischen Diagnosestellung berechnet. Als lokoregionäre Kontrolle wurde die Abwesenheit von lokalen und/oder regionalen Rezidiven und Tumorprogress definiert.

Der Einfluss der p53-, EGFR- und SGLT1-Expression auf das Gesamtüberleben und die lokoregionäre Kontrolle wurde mittels Cox-Proportional-Hazards-Analyse (Cox-Regression) geprüft. Unterschiede zwischen den jeweils definierten Gruppen wurden mit dem Log-Rank-Test berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Remission, Nachbeobachtungszeitraum und Gesamtüberleben

Bei 126 der 233 Patienten (54,08 %) wurde nach Abschluss der Radiochemotherapie eine komplette Remission beobachtet. Eine partielle Remission im Sinne einer Verkleinerung der Tumormasse um mindestens 50 % wurde bei 48 Patienten (20,6 %) dokumentiert. 19 Patienten (8,15 %) wiesen einen unveränderten Befund auf (*stable disease*) und 20 Patienten (8,58 %) zeigten einen Tumorprogress nach Abschluss der Radio(chemo)therapie. Bei weiteren 20 Patienten (8,58 %) gab es keine Angaben zum Krankheitsstatus nach Abschluss der Therapie.

Der Nachbeobachtungszeitraum betrug im Mittel 13,1 Monate (Range 9 Tage bis 122,1 Monate). Bei 8 Patienten wurde ein *Lost to Follow up* dokumentiert.

Zum Zeitpunkt des Studienendes lebten noch 48 Patienten (20,6 %), 185 Patienten (79,4 %) verstarben im Laufe des beobachteten Zeitraums. 127 Patienten (54,51 %) verstarben tumorbedingt, bei 58 Patienten (24,89 %) war die Todesursache nicht primär tumorassoziiert.

Insgesamt betrugen die 3- und 5-Jahres-Überlebensraten 30,71 % und 22,08 %.

In Tabelle 28 im Anhang findet sich eine Übersicht zu diesen Daten. Die graphische Darstellung des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens bezogen auf das gesamte Kollektiv finden sich in Abbildung 29 und Abbildung 30 im Anhang.

3.2 Expression der molekularen Gewebemarker

Bei der immunhistochemischen Auswertung von p53 zeigte sich sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Anfärbung. Ein p53-positives Färbemuster wurde in 217 (93,13 %) der Tumorproben beobachtet. In 22 Gewebeproben (9,44 %) fand sich keine nukleäre Anfärbung. Kein zytoplasmatisches Färbemuster wurde in 50 Proben (21,46 %) beobachtet. Der Mittelwert für den H-Score der p53-Expression im Zellkern betrug 141,05 (Range 0-290). Bei einer p53-Expression im Zytoplasma wurde ein Mittelwert von 86,07 (Range 0-280) ermittelt. Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen beispielhaft die beobachtete p53-Expression.

Bei der Auswertung der EGFR-Expression fand sich sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma und in der Zellmembran ein positives Färberesultat. Bei 224 (96,14 %) Karzinomen zeigte sich eine Anfärbbarkeit des EGFR. 143 (61,37 %) Proben zeigten kein Färberesultat im Zellkern, 26 (11,16 %) Proben waren in der Zellmembran

EGFR-negativ. Neun Proben (3,86 %) zeigten kein zytoplasmatisches EGFR-Färbemuster (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 12).

Es wurden folgende Mittelwerte für die H-Scores berechnet: EGFR im Zellkern 10,79 (Range 0-95), EGFR im Zytoplasma 144,46 (Range 0-300) und EGFR in der Zellmembran 155,45 (Range 0-300).

Die Immunhistochemie des SGLT1 lieferte ein nukleäres und zytoplasmatisches Färbemuster (vgl. Abbildung 13 und Abbildung 14). 181 (77,69 %) der Gewebeproben waren SGLT1-positiv, 97 (41,63 %) Proben zeigten kein nukleäres Färbemuster. 63 (27,04 %) Tumorbiopsien zeigten keine Anfärbbarkeit im Zytoplasma durch den SGLT1-Antikörper. Die Mittelwerte der H-Scores lagen bei 31,35 (Range 0-155) für SGLT1 im Zellkern und 57,45 (Range 0-195) bei einer zytoplasmatischen Expression.

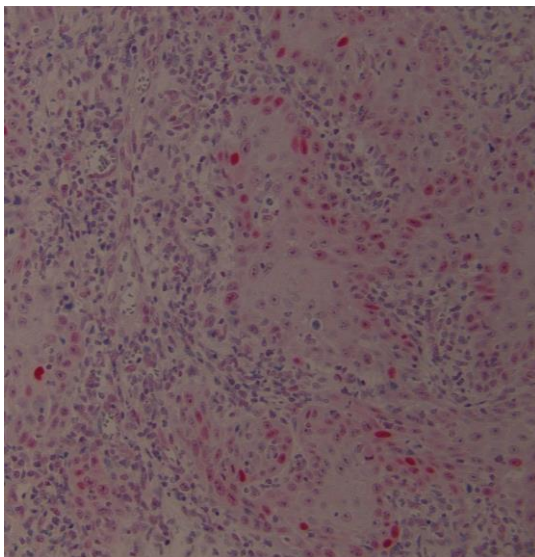


Abbildung 9: p53-Färbung bei Mundhöhlen-Karzinom; 20fache Vergrößerung

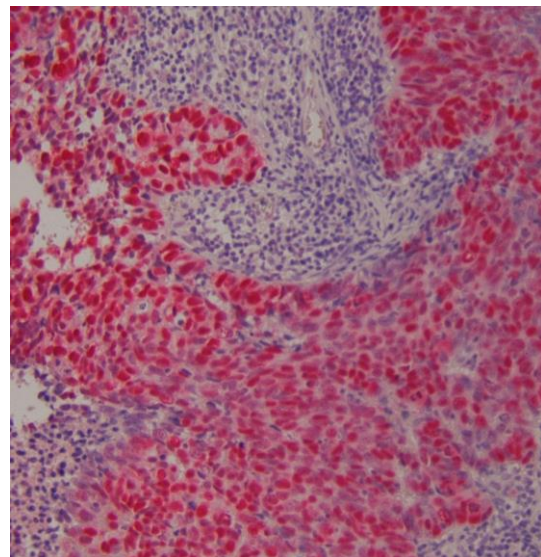


Abbildung 10: p53-Färbung bei Larynx-Karzinom; 20fache Vergrößerung

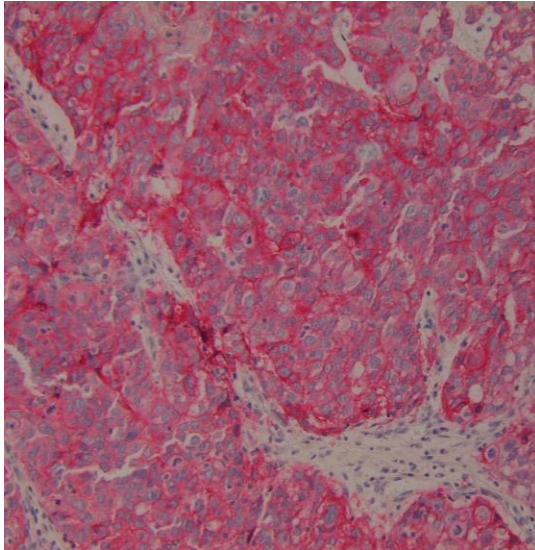


Abbildung 11: EGFR-Färbung bei Larynx-Karzinom; 20fache Vergrößerung

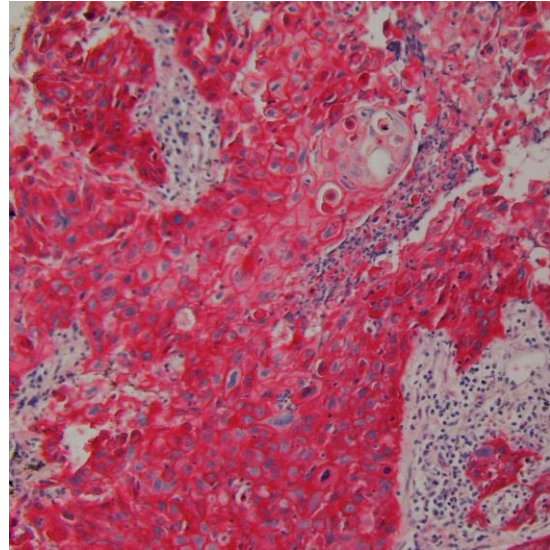


Abbildung 12: EGFR-Färbung bei Zungengrund-Karzinom; 20fache Vergrößerung

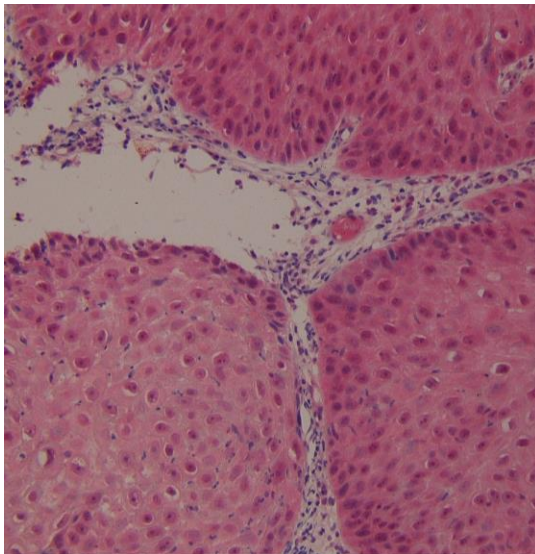


Abbildung 13: SGLT1-Färbung bei Mundboden-Karzinom; 20fache Vergrößerung

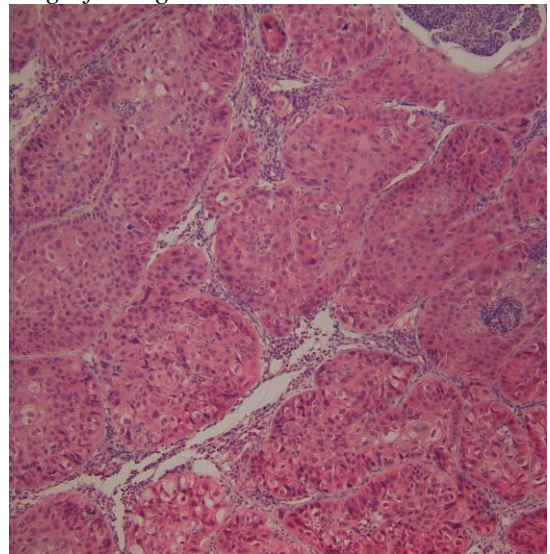


Abbildung 14: SGLT1-Färbung bei Hypopharynx-Karzinom; 10fache Vergrößerung

3.3 Korrelation der molekularen Gewebemarker

Die p53-Expression im Zellkern zeigte eine statistisch signifikante Korrelation zu der membranösen EGFR-Expression ($r = 0,2485$; $p = 0,00013$) sowie der SGLT1-Expression im Zellkern ($r = 0,193$; $p = 0,031$) und im Zytoplasma ($r = 0,2168$; $p = 0,0009$).

Auch die p53-Expression im Zytoplasma korrelierte mit der SGLT1-Expression im Zytoplasma ($r = 0,2199$; $p = 0,00072$).

Des Weiteren zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf die Expression von SGLT1 im Zellkern ($r = 0,2070$; $p = 0,0015$).

Eine erhöhte SGLT1-Expression im Zellkern korrelierte mit hohen Expressionswerten von SGLT1 im Zytoplasma ($r = 0,6104$; $p \leq 0,00001$).

Die Darstellung der zugehörigen Streudiagramme findet sich in Abbildung 15 bis 20.

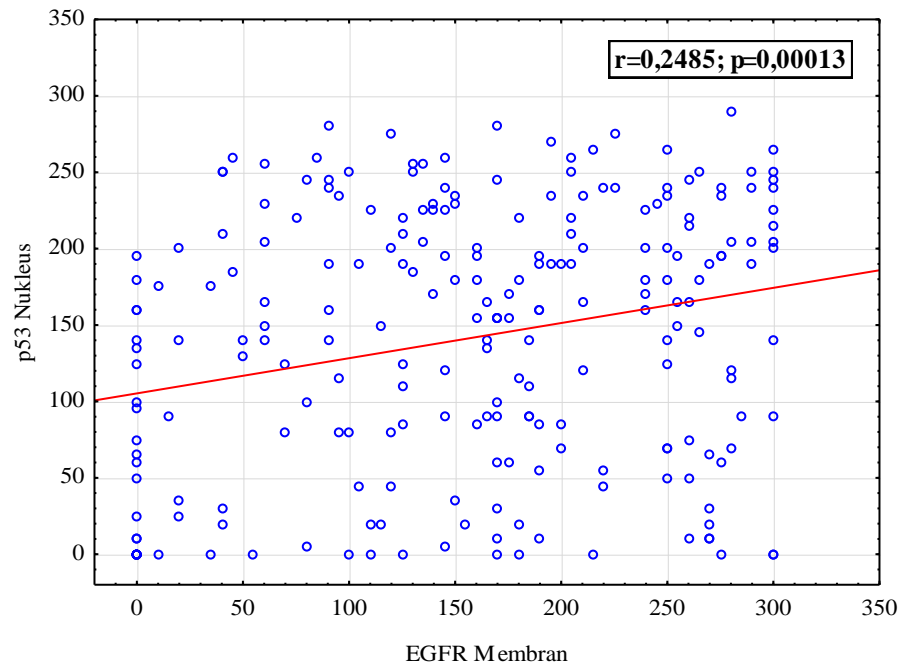


Abbildung 15: Streudiagramm der p53-Expression im Zellkern und der EGFR-Expression in der Zellmembran

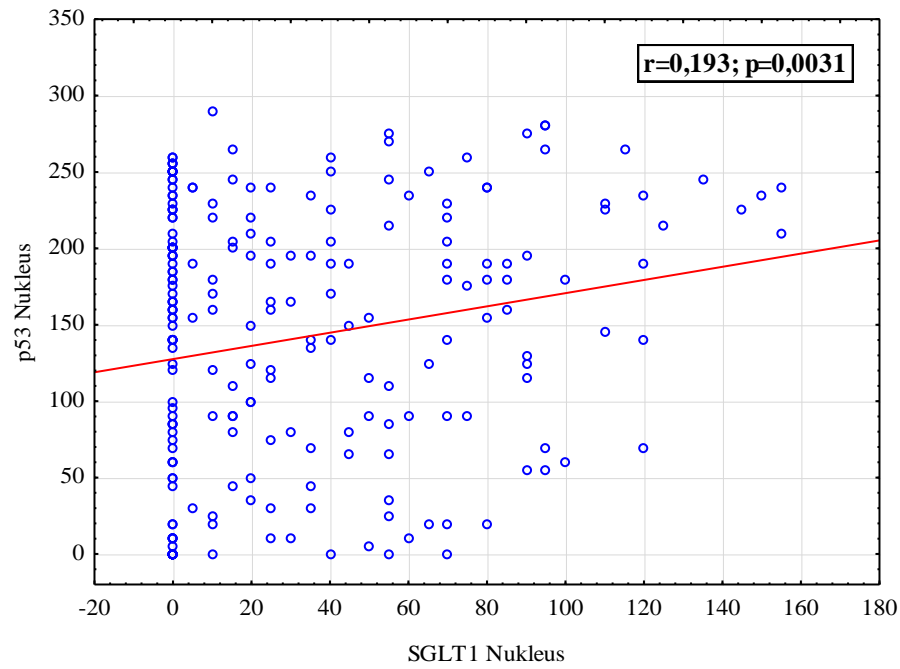


Abbildung 16: Streudiagramm der p53-Expression im Zellkern und der SGLT1-Expression im Zellkern

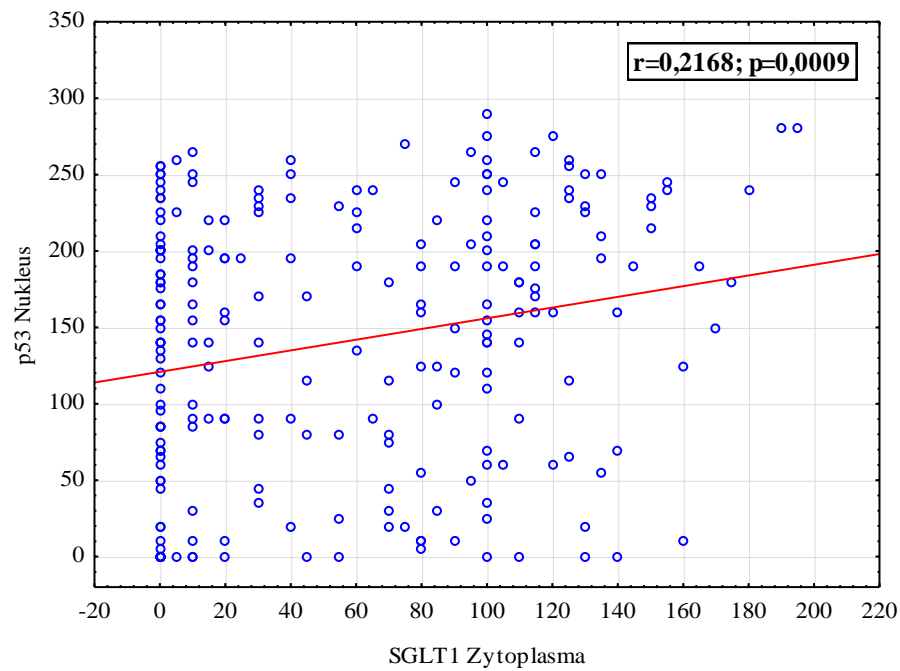


Abbildung 17: Streudiagramm der p53-Expression im Zellkern und der SGLT1-Expression im Zytoplasma

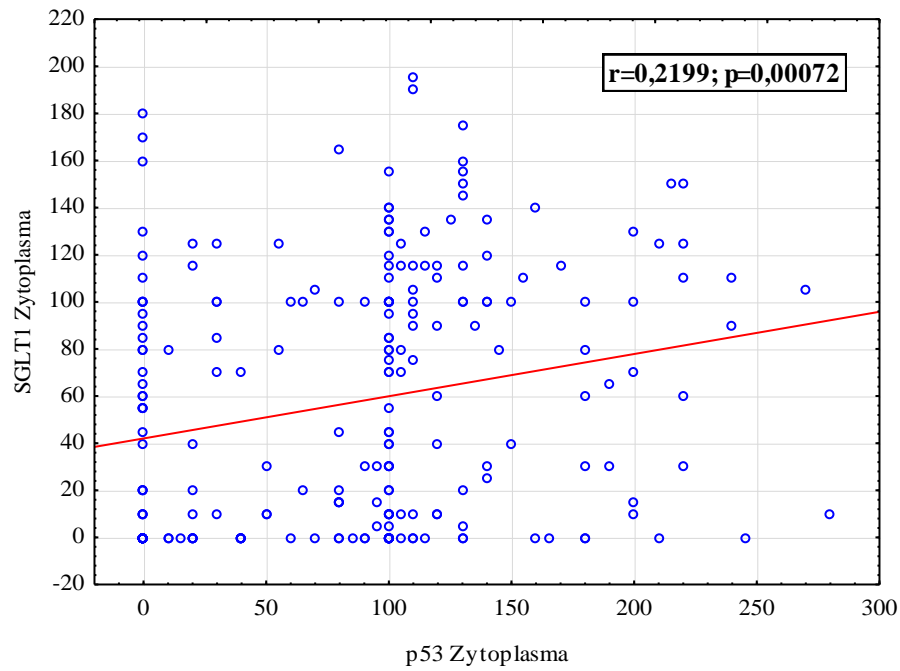


Abbildung 18: Streudiagramm der SGLT1-Expression im Zytoplasma und der p53-Expression im Zytoplasma

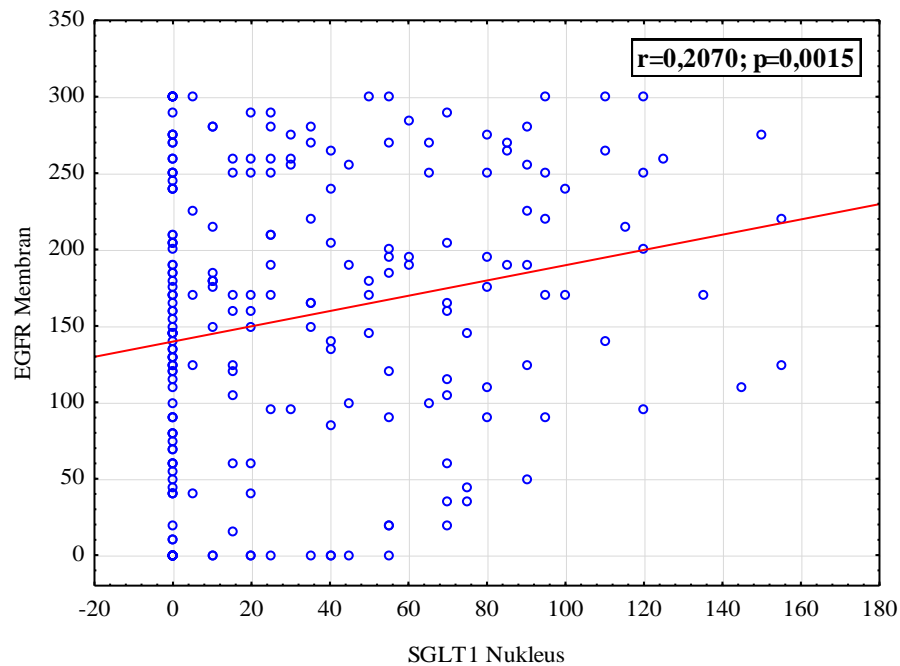


Abbildung 19: Streudiagramm der EGFR-Expression in der Zellmembran und der SGLT1-Expression im Zellkern

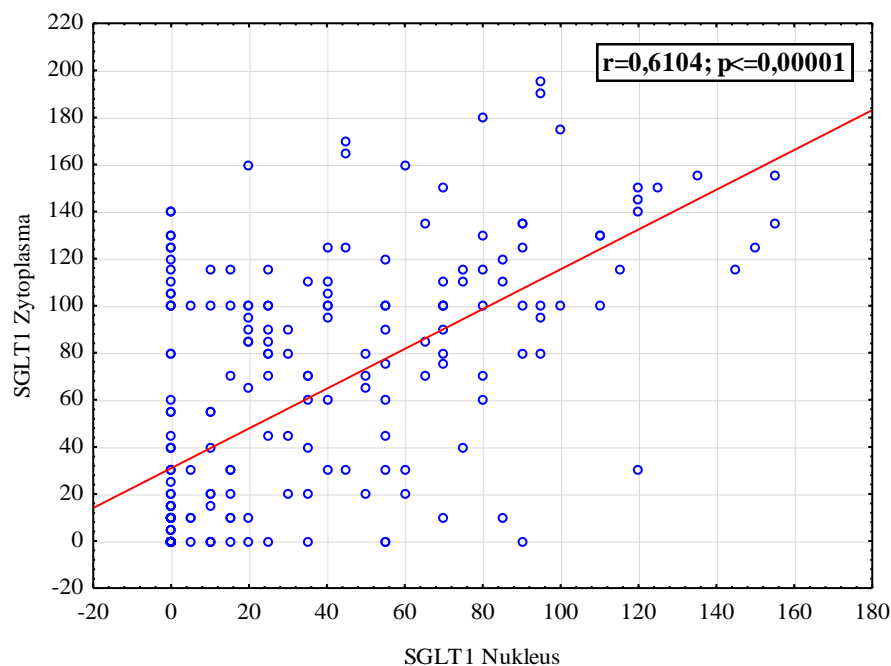


Abbildung 20: Streudiagramm der SGLT1-Expression im Zytoplasma und der SGLT1-Expression im Zellkern

3.4 Toxizität

217 der 233 Patienten (93,13 %) erhielten die geplante Gesamtdosis. Bei 16 Patienten (6,87 %) wurde die Radiotherapie vor Erreichen der geplanten Gesamtdosis aufgrund akuter Nebenwirkungen oder mangelnder Compliance abgebrochen. Die applizierte Dosis war in diesen Fällen im Schnitt um 13 Gy geringer als die geplante Gesamtdosis.

170 Patienten (72,96 %) erhielten eine konkominante Chemotherapie. Bei 13 Patienten (5,58 %) wurde die Chemotherapie vor Erreichen der Gesamtdosis aufgrund akuter Nebenwirkungen frühzeitig abgebrochen.

Hämatotoxizität trat wie folgt auf: Bei 41 Patienten in Form einer Anämie Grad 1. 59 Patienten hatten eine Anämie Grad 2 und 11 Patienten eine Anämie Grad 3. 122 Patienten zeigten keine Anämie (Grad 0).

123 Patienten zeigten keine Leukopenie (Grad 0), 35 Patienten entwickelten eine Leukopenie Grad 1, 42 Patienten eine Leukopenie Grad 2, 26 Patienten eine Leukopenie Grad 3 und sieben Patienten eine Leukopenie Grad 4.

Eine Thrombopenie 1. Grades zeigte sich bei 19 Patienten, bei sieben Patienten entwickelte sich eine Thrombopenie Grad 2, bei drei Patienten eine Thrombopenie

Grad 3 und ein Patient entwickelte eine Thrombopenie 4. Grades. 203 Patienten entwickelten keine Thrombopenie (Grad 0).

Im Rahmen der Therapie wurde das Auftreten akuter Organtoxizität wie folgt dokumentiert: 231 Patienten entwickelten eine Mukositis (58 Patienten Grad 1; 131 Patienten Grad 2; 42 Patienten Grad 3). Bei 232 Patienten wurde eine akute Hautreaktion beobachtet (82 Patienten Grad 1; 135 Patienten Grad 2; 15 Patienten Grad 3). Dysphagie trat bei 196 Patienten auf (92 Patienten Grad 1, 70 Patienten Grad 2; 34 Patienten Grad 3). In 51 Fälle wurde das Auftreten von Übelkeit unter der Therapie dokumentiert (36 Patienten Grad 1; 15 Patienten Grad 2).

Das Auftreten von chronischen Nebenwirkungen der Radio(chemo)therapie wurde im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen wie folgt erfasst: 206 Patienten entwickelten eine Xerostomie (129 Patienten Grad 1; 55 Patienten Grad 2; 22 Patienten Grad 3). Bei 40 Patienten wurde Heiserkeit beobachtet (35 Patienten Grad 1; 5 Patienten Grad 2). Bei drei Patienten wurde eine subkutane Fibrose Grad 1 beobachtet.

Eine Veränderung des Geschmacks wurde bei 35 Patienten dokumentiert (29 Patienten Grad 1; sechs Patienten Grad 2).

21 Patienten mussten aufgrund einer Lymphödems behandelt werden (19 Patienten Grad 1; zwei Patienten Grad 2). neun Patienten entwickelten einen Trismus Grad 1, ein Patient eine Osteoradionekrose Grad 1, und vier Patienten eine Fistel .

Bei insgesamt acht Patienten waren die Angaben bezüglich einzelner chronischer Nebenwirkungen unvollständig.

Tabelle 7 bietet eine Übersicht über die aufgetretenen Akut- und Spätnebenwirkungen des untersuchten Kollektivs.

Tabelle 7: Übersicht über das Auftreten von akuter und chronischer Toxizität

		Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4	keine Angaben
<u>Akute Toxizität</u>	Hämatotoxizität						
	Hämoglobin	122	41	59	11	-	-
	Leukozyten	123	35	42	26	7	-
	Thrombozyten	203	19	7	3	1	-
	Organtoxizität						
	Mukositis	2	58	131	42	-	-
	Hautreaktion	1	82	135	15	-	-
	Dysphagie	37	92	70	34	-	-
	Übelkeit	182	36	15	-	-	-
<u>Chron. Toxizität</u>	Xerostomie	27	129	55	22	-	-
	Heiserkeit	193	35	5	-	-	1
	Fibrose	230	3	-	-	-	-
	Geschmack	197	29	6	-	-	1
	Lymphödem	210	19	2	-	-	2
	Trismus	222	9	-	-	-	2
	Osteonekrose	231	1	-	-	-	1
	Fistel	228	4	-	-	-	1

3.5 Expression molekularer Gewebemarker beim Auftreten höhergradiger Toxizität

Untersucht wurde die Expression der molekularen Marker p53, EGFR und SGLT1 bezogen auf höhergradige hämatotoxische und organtoxische Nebenwirkungen (CTCAE ≥ 3) sowie die Gesamtttoxizität.

3.5.1 Expression molekularer Gewebemarker bei der Ausbildung höhergradiger hämatotoxischer Nebenwirkungen

42 der insgesamt 233 Patienten (18,03 %) entwickelten unter der Radio(chemo)therapie höhergradige hämatotoxische Nebenwirkungen. 191 Patienten (80,69 %) zeigten laborchemisch keine Anzeichen einer Hämatotoxizität oder hämatotoxische Nebenwirkungen, die niedriger als Grad 3 der CTCAE waren. Bei drei Patienten (1,29 %) fehlen die Angaben bezüglich der Ausbildung hämatotoxischer Nebenwirkungen.

Die Expression von p53, EGFR und SGLT1 in den unterschiedlichen Zellkompartimenten wurde in Bezug auf die Entwicklung höhergradiger hämatotoxischer Nebenwirkungen untersucht.

Weder die nukleäre p53-Expression ($p = 0,94$) noch die Expression von p53 im Zytoplasma ($p = 0,62$) zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied bei Patienten mit höhergradigen hämatotoxischen Nebenwirkungen im Vergleich zu Patienten ohne Anzeichen einer höhergradigen Hämatotoxizität.

Auch für den EGFR zeigte sich keine statistisch signifikante Differenz in Bezug auf hämatotoxische Nebenwirkungen: EGFR im Zellkern ($p = 0,11$), EGFR im Zytoplasma ($p = 0,62$), EGFR in der Zellmembran ($p = 0,82$).

Eine statistisch unterschiedliche Expression von SGLT1 bei Patienten mit höhergradigen hämatotoxischen Nebenwirkungen im Vergleich zu Patienten ohne ebendiese Nebenwirkungen wurde nicht beobachtet ($p = 0,82$ für SGLT1 im Zellkern; $p = 0,93$ für SGLT1 im Zytoplasma). Die graphischen Darstellungen der molekularen Marker bezogen auf die Entwicklung höhergradiger, hämatotoxischer Nebenwirkungen finden sich in Abbildung 31 bis Abbildung 37 im Anhang.

3.5.2 Expression molekularer Gewebemarker bei der Ausbildung organotoxischer Nebenwirkungen

Zur Beurteilung der Expression der Gewebemarker bei organotoxischen Nebenwirkungen wurden sowohl einzelne Akutnebenwirkungen wie Mukositis, Hautreaktionen, Dysphagie und Übelkeit, als auch eine Zusammenschau der Organotoxizität analysiert.

Bei verschiedenen Schweregraden der Mukositis wurde keine signifikant unterschiedliche p53-Expression im Zellkern ($p = 0,91$) und im Zytoplasma ($p = 0,98$) festgestellt.

Gleiches gilt sowohl für die Expression des EGFR im Zellkern ($p = 0,8$), im Zytoplasma ($p = 0,96$) und als auch in der Zellmembran ($p = 0,78$). Auch bei der SGLT1-Expression im Zellkern ($p = 0,35$) und im Zytoplasma ($p = 0,36$) wurde das Signifikanzniveau bezogen auf die Schweregrade der Mukositis nicht erreicht. Die graphische Darstellung dieser Analysen findet sich in Abbildung 38 bis 44 im Anhang.

Bei Hautreaktionen in Form radiogener Dermatitis zeigte sich weder bei einer nukleären p53-Expression ($p = 0,78$) noch bei einer Expression im Zytoplasma ($p = 0,41$) ein statistisch signifikanter Unterschied. Die Expressionen von EGFR im Zellkern ($p = 0,53$), im Zytoplasma ($p = 0,29$) und in der Zellmembran ($p = 0,29$) divergierten bei Patienten mit unterschiedlichen Schweregraden der Hautreaktion ohne statistische Signifikanz.

Genauso zeigten auch die SGLT1-Expression im Zellkern ($p = 0,28$) und im Zytoplasma ($p = 0,23$) keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abbildung 45 bis Abbildung 51 im Anhang).

Bei Dysphagie konnte ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der p53-Expression im Zytoplasma festgestellt werden: Patienten, die eine Dysphagie 3. Grades entwickelten, zeigten im Vergleich zu Patienten mit Dysphagie Grad 0 bis 2 eine höhere Expression des Markers ($p = 0,015$).

Die Boxplot-Analyse der zytoplasmatischen p53-Expression bezogen auf Schluckbeschwerden Grad 0 bis 3 finden sich in Abbildung 21.

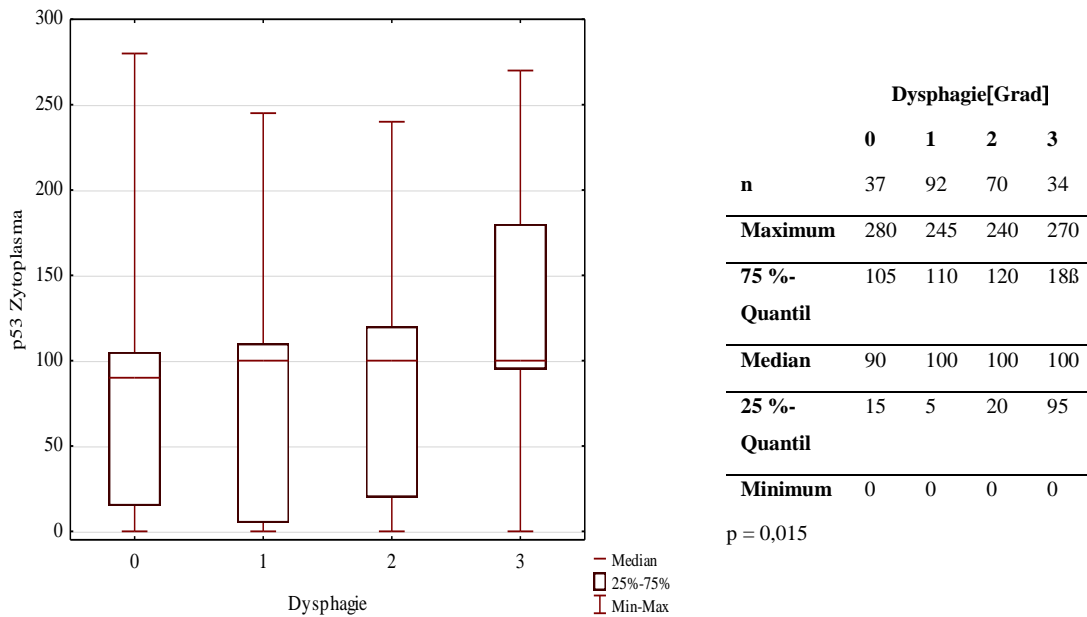


Abbildung 21: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3

Die Expression von EGFR im Zellkern zeigte einen statistischen Trend bezogen auf die Entwicklung von Schluckbeschwerden (p = 0,099). Abbildung 22 zeigt eine graphische Darstellung der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf unterschiedliche Schweregrade der Dysphagie.

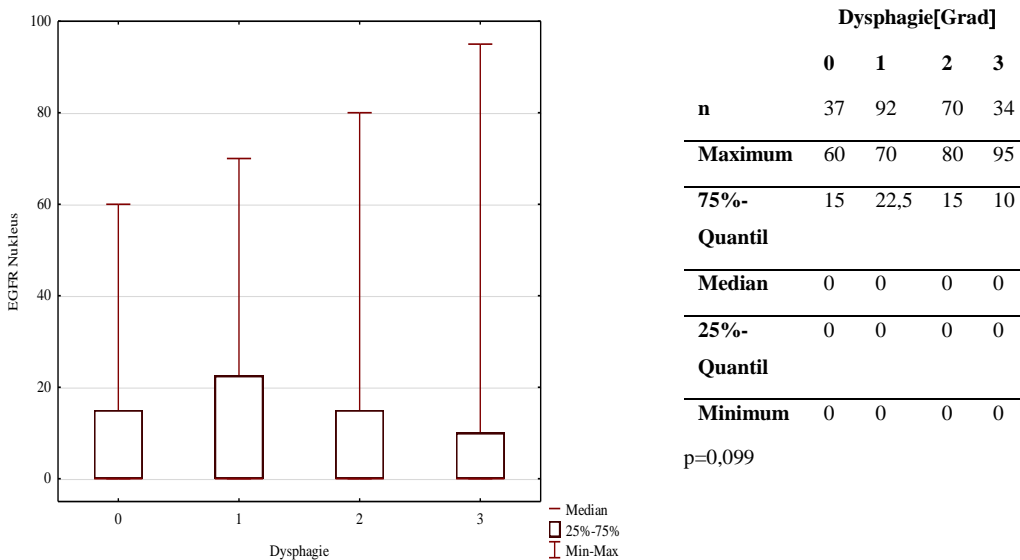


Abbildung 22: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3

Für die folgenden Parameter konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der unterschiedlichen Schweregrade der Dysphagie festgestellt werden: p53 im Zellkern ($p = 0,89$), EGFR im Zytoplasma ($p = 0,59$), EGFR in der Zellmembran ($p = 0,11$), SGLT1 im Zellkern ($p = 0,92$) und SGLT1 im Zytoplasma ($p = 0,96$). Abbildung 52 bis 56 im Anhang zeigen die Boxplot-Analysen der drei untersuchten Gewebemarker bezogen auf die Schweregrade der Dysphagie.

Bei Patienten mit Übelkeit zeigte sich zwischen den dokumentierten Schweregraden 0 bis 2 ein statistisch signifikanter Unterschied der EGFR-Expression im Zellkern ($p = 0,046$).

Abbildung 23 zeigt die Boxplot-Analyse der nukleären EGFR-Expression bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2.

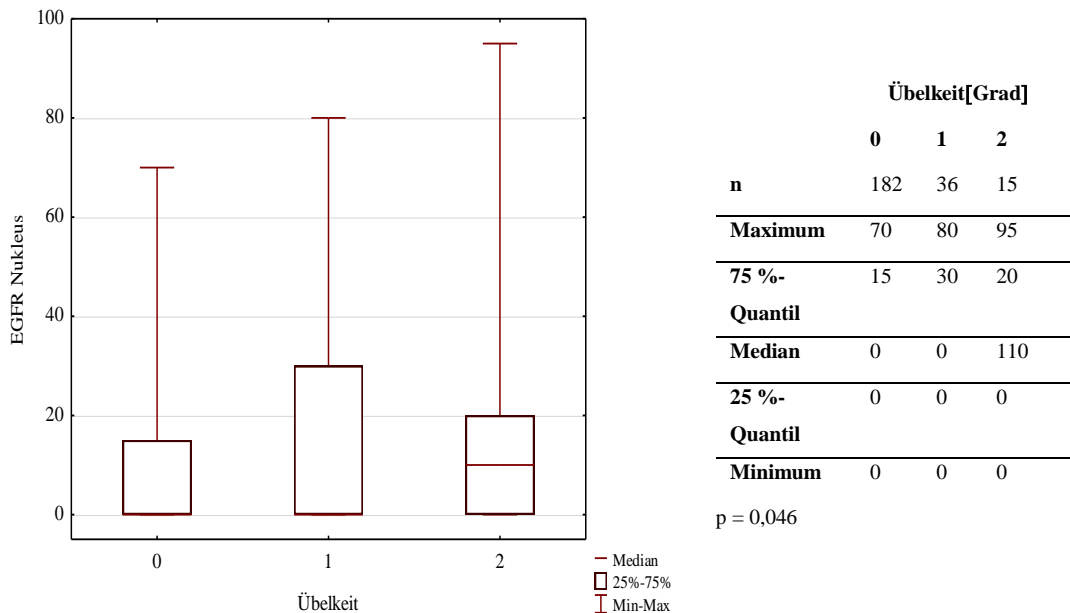


Abbildung 23: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2

Bei den übrigen untersuchten Gewebemarkern wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht: p53 im Zellkern ($p = 0,41$), p53 im Zytoplasma ($p = 0,23$), EGFR im Zytoplasma ($p = 0,97$), EGFR in der Zellmembran ($p = 0,81$), SGLT1 im Zellkern ($p = 0,9$) und SGLT1 im Zytoplasma ($p = 0,63$). Die graphischen Darstellungen finden sich in Abbildung 57 bis 62 im Anhang.

77 (33,05 %) der insgesamt 233 untersuchten Patienten entwickelten im Verlauf höhergradige organotoxische Nebenwirkungen (CTCAE \geq Grad 3). 156 (66,95 %) Patienten zeigten keine Anzeichen für höhergradige organotoxische Nebenwirkungen. Weder bei einer nukleären p53-Expression ($p = 0,95$) noch einer Expression von p53 im Zytoplasma ($p = 0,19$) zeigten sich Unterschiede bei Patienten mit einer höhergradigen Organotoxizität und Patienten ohne höhergradige organotoxische Nebenwirkungen.

Auch bei der Expression des EGFR im Zellkern ($p = 0,73$), im Zytoplasma ($p = 0,94$) und in der Zellmembran ($p = 0,34$) wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Die Expression von SGLT1 im Zellkern ($p = 0,19$) und im Zytoplasma ($p = 0,77$) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne höhergradiger Organotoxizität.

Abbildung 63 bis Abbildung 69 im Anhang zeigen die Boxplot-Analysen der unterschiedlichen Gewebemarker bezogen auf eine höhergradige Organotoxizität.

3.5.3 Expression der molekularen Gewebemarker bei der Ausbildung höhergradiger Gesamtnebenwirkungen

103 Patienten des Gesamtkollektivs (44,2 %) zeigten im Verlauf der Radio(chemo)therapie eine höhergradige Gesamttoxizität. Diese setzt sich sowohl aus höhergradigen hämatotoxischen als auch organotoxischen Nebenwirkungen zusammen. 130 Patienten (55,79 %) zeigten keine Anzeichen für eine höhergradige Gesamttoxizität.

Die Boxplot-Analysen zum Vergleich der Expression der einzelnen Gewebemarker in Bezug auf Patienten mit und ohne Auftreten einer höhergradigen Gesamttoxizität sind in Abbildung 70 bis Abbildung 76 im Anhang dargestellt.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Expression von p53 im Zellkern ($p = 0,91$) und im Zytoplasma ($p = 0,55$) zwischen Patienten mit und Patienten ohne einer höhergradigen Gesamttoxizität.

Weder bei EGFR im Zellkern ($p = 0,71$), EGFR im Zytoplasma ($p = 0,51$) noch EGFR in der Zellmembran ($p = 0,4$) wurde das Signifikanzniveau erreicht.

Auch bei einer Betrachtung der SGLT1-Expression im Zellkern ($p = 0,5$) und im Zytoplasma ($p = 0,93$) zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne einer höhergradigen Gesamttoxizität.

3.6 Lokoregionäre Kontrolle sowie Auftreten von Fernmetastasen und Zweittumoren

Das Auftreten von lokoregionären Rezidiven im Sinne eines Rezidivs nach kompletter Remission bzw. eines Tumorprogresses nach partieller Remission wurde bei insgesamt 66 Patienten (28,33 %) diagnostiziert. Bei 44 Patienten (18,88 %) war initial das Rezidiv ausschließlich lokal, auf den Bereich des ursprünglichen Primärtumors begrenzt. Acht Patienten (3,43 %) wiesen alleinig ein regionäres Rezidiv im Bereich des lokoregionalen Lymphabflussgebietes auf. Lokale und regionale Rezidive wurden bei insgesamt 14 Patienten (6,01 %) beobachtet.

Der Zeitraum nach Therapieende bis zum Auftreten eines Rezidivs betrug im Mittel 4,9 Monate (Range 0,06-115,63 Monate). Die lokoregionäre Kontrolle allgemein betrug nach drei Jahren 63 % und nach fünf Jahren 58 % (vgl. Abbildung 77 im Anhang).

Nach Abschluss der Therapie traten bei 28 Patienten (12,02 %) Fernmetastasen auf. 15 Patienten (6,44 %) wiesen pulmonale Metastasen auf, vier Patienten (1,72 %) ossäre Metastasen, drei Patienten (1,28 %) kutane Metastasen, zwei Patienten (0,86 %) hepatische Metastasen und ein Patient (0,43 %) Metastasen im Bereich der Pleura. Insgesamt vier Patienten (1,72 %) hatten Metastasen in mehreren Organen (Ein Patient pulmonale und ossäre Metastasen, ein Patient pulmonale und hepatische Metastasen, ein Patient ossäre und hepatische Metastasen und ein Patient ossäre und mediastinale Metastasen). Der Zeitraum nach Therapieende bis zum Auftreten von Metastasen betrug im Mittel 6,4 Monate (Range 0,23-32,93 Monate). Das metastasenfremde Überleben des Gesamtkollektivs betrug nach drei Jahren 85,47 % und nach 5 Jahren 83,26 % (vgl. Abbildung 78 im Anhang).

Bei 18 Patienten (7,73 %) wurde ein Zweittumor diagnostiziert: sechs Patienten mit Bronchialkarzinomen, sechs Patienten mit Ösophaguskarzinomen, ein Patient mit chronisch lymphatischer Leukämie, ein Patient mit Magenkarzinom, ein Patient mit Harnblasenkarzinom, ein Patient mit Plattenepithelkarzinom der Unterlippe, ein Patient mit Bronchialkarzinom und Lymphom und ein Patient mit Verdacht auf Tumoren im Bereich der Lunge und Niere.

In Tabelle 29 im Anhang findet sich eine Zusammenfassung dieser Daten.

3.7 Expression der molekularen Gewebemarker bezogen auf das Outcome

Auf den erhobenen Daten basierend, erfolgte die Überlebenszeitanalyse anhand von Kaplan-Meier-Schätzern zur Berechnung des krankheitsfreien Überlebens, der lokoregionären Kontrolle, des metastasenfrien Überlebens und des Gesamtüberlebens.

3.7.1 Expression der molekularen Gewebemarker bezogen auf das krankheitsfreie Überleben

In Abbildung 79 im Anhang ist die Kaplan-Meier-Kurve für das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher Expression von p53 im Zellkern dargestellt.

Nach sieben Jahren zeigten 32,12 % der Patienten mit niedriger p53-Expression im Zellkern ein krankheitsfreies Überleben. Bei den Patienten mit mittlerer und hoher p53-Expression waren es zum gleichen Zeitpunkt 28,21 % bzw. 38,78 %. Ein statistisch signifikanter Unterschied des krankheitsfreien Überlebens bezüglich der p53-Expression im Zellkern wurde nicht gefunden ($p = 0,49$).

Abbildung 80 im Anhang zeigt die Überlebenszeitanalysen für das krankheitsfreie Intervall bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zytoplasma.

30,56 % der Patienten mit niedriger p53-Expression und 28,78 % der Patienten mit mittlerer p53-Expression im Zytoplasma zeigten nach sieben Jahren einen krankheitsfreien Verlauf. Im Vergleich dazu zeigten nach drei Jahren 35,87 % der Patienten mit hoher p53-Expression im Zytoplasma ein krankheitsfreies Überleben ($p = 0,48$).

Kein statistisch signifikanter Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben konnte für EGFR im Zellkern ($p = 0,22$), EGFR im Zytoplasma ($p = 0,16$) und EGFR in der Zellmembran ($p = 0,52$) nachgewiesen werden. Auch die SGLT1-Expression im Zellkern und Zytoplasma erreichten nicht das Signifikanzniveau bezogen auf das krankheitsfreie Überleben ($p = 0,57$ und $p = 0,53$).

Die Kaplan-Meier-Analysen dieser Daten sind in Abbildung 81 bis 85 im Anhang wiedergegeben.

3.7.2 Expression der molekularen Gewebemarker bezogen auf das metastasenfrie Überleben

Abbildung 86 im Anhang zeigt die Kaplan-Meier-Schätzer des metastasenfrien Überlebens bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zellkern.

Nach sieben Jahren waren 90 % der Patienten mit einer niedrigen p53-Expression und 82,94 % der Patienten mit hoher p53-Expression ohne Metastasen. Patienten mit mittlerer p53-Expression zeigten das kürzeste metastasenfrie Überleben: nach sieben Jahren lieferten 77,57 % keinen Hinweis auf Filiae ($p = 0,51$).

Die Überlebenszeitanalysen des metastasenfrien Überlebens bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zytoplasma sind in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

Patienten mit einer hohen p53-Expression zeigten im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen und mittleren Expression im Zytoplasma ein statistisch signifikant verkürztes metastasenfries Überleben ($p = 0,017$). In der Untergruppe mit einer niedrigen p53-Expression waren nach sieben Jahren 91,42 % ohne Metastasen, wohingegen 84,14 % der Patienten mit mittlerer Expression und 74,8 % der Patienten mit hoher Expression zum gleichen Zeitpunkt keine Metastasen zeigten.

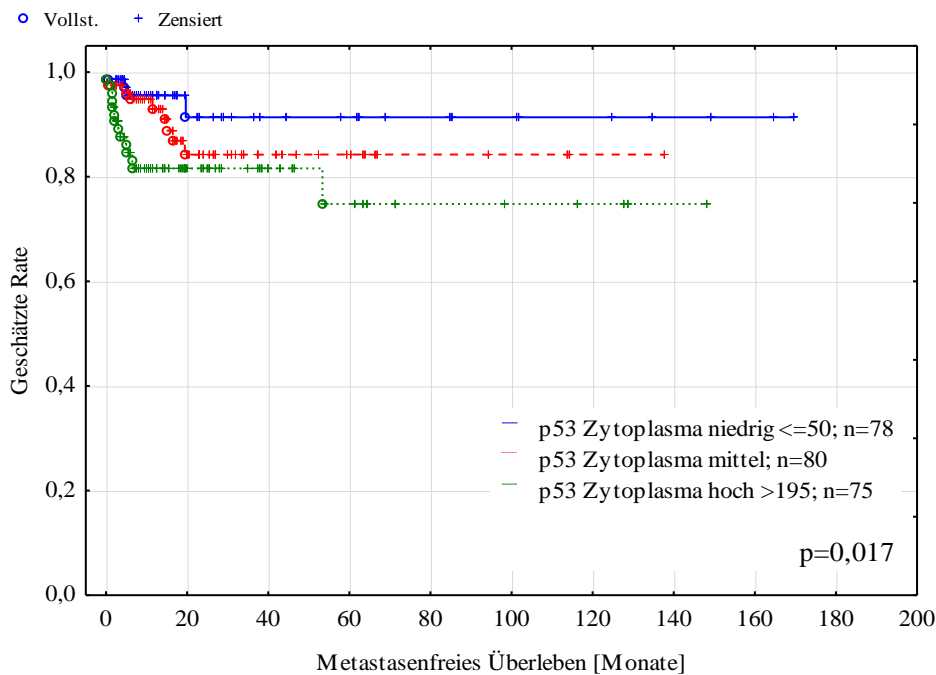


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Schätzer für das metastasenfrie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zytoplasma

Abbildung 87 im Anhang stellt die Kaplan-Meier-Schätzer des metastasenfrenen Überlebens bei Patienten mit unterschiedlich hoher Expression des EGFR im Zellkern dar. Zwischen den einzelnen Untergruppen der EGFR-Expression im Zellkern wurde kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt ($p = 0,28$).

Die Kaplan-Meier-Analysen des metastasenfrenen Überlebens bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher Expression des EGFR im Zytoplasma finden sich in Abbildung 88 im Anhang. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den Überlebenszeiten: nach sieben Jahren waren 88,93 %, 85,54 % bzw. 76,66 % frei von Metastasen ($p = 0,79$).

Die Überlebenszeitanalyse des metastasenfrenen Überlebens bei Patienten mit einer EGFR-Expression der Zellmembran lieferte ähnliche Ergebnisse (vgl. Abbildung 89 im Anhang): Nach sieben Jahren zeigten 80,06 % (niedriger EGFR), 84,85 % (mittlerer EGFR) und 87,07 % (hoher EGFR) keine Anzeichen für Filiae. Auch hier wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p = 0,76$).

In Abbildung 90 und 91 im Anhang sind die Kaplan-Meier-Analysen des metastasenfrenen Überlebens bei Patienten mit unterschiedlicher SGLT1-Expression dargestellt.

Nach sieben Jahren waren bei 82,24 % der Patienten mit niedriger SGLT1-Expression, bei 84,66 % der Patienten mit mittlerer und 85,41 % der Patienten mit hoher Expression im Zellkern keine Metastasen zu beobachten ($p = 0,64$).

Bezüglich des metastasenfrenen Überlebens bei Patienten mit unterschiedlicher SGLT1-Expression im Zytoplasma konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Untergruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Expression festgestellt werden ($p = 0,95$).

3.7.3 Expression der molekularen Gewebemarker bezogen auf die lokoregionäre Kontrolle

Zur Bewertung der Expression der molekularen Marker bezogen auf die lokoregionäre Kontrolle wurde die unterschiedliche Expression von p53, EGFR und SGLT1 bezogen auf den Zeitraum nach Therapieende bis zum Auftreten eines Rezidives analysiert.

Abbildung 92 im Anhang gibt die Kaplan-Meier-Schätzer des rezidivfreien Überlebens bei Patienten mit unterschiedlicher Expression von p53 im Zellkern wieder.

Zwischen einer niedrigen, mittleren und hohen p53-Expression wurde kein statistisch signifikanter Unterschied bezogen auf die lokoregionäre Kontrolle gefunden ($p = 0,7$).

Patienten mit einer hohen p53-Expression im Zytoplasma zeigten im Vergleich zu Patienten mit niedriger und mittlerer Expression einen statistischen Trend zu einem verkürzten rezidivfreien Überleben ($p = 0,087$). Nach sieben Jahren waren von diesen Patienten noch 42,31 % rezidivfrei im Vergleich zu 65,54 % Patienten bzw. 60,22 % Patienten (vgl. Abbildung 25).

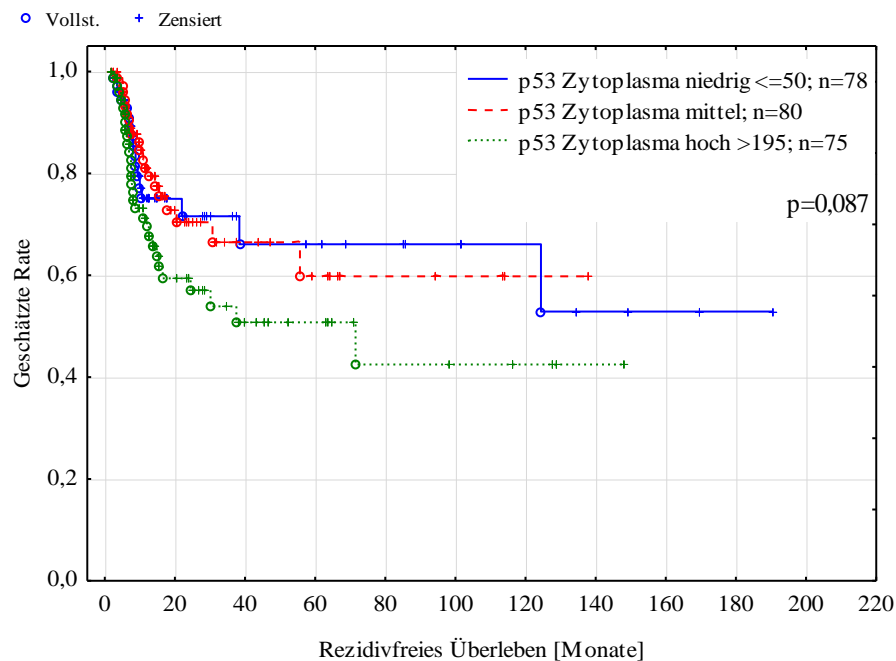


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Schätzer für das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zytoplasma

Sowohl bei Patienten mit unterschiedlicher Expression des EGFR im Zellkern als auch im Zytoplasma konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der EGFR-Expression bezogen auf die lokoregionäre Kontrolle festgestellt werden ($p = 0,8$ bzw. $p = 0,82$). Die Überlebenszeitanalysen der nukleären EGFR-Expression bzw. der Expression im Zytoplasma sind in Abbildung 93 und 94 im Anhang wiedergegeben.

Nach sieben Jahren waren 70,43 % der Patienten mit niedriger EGFR-Expression in der Zellmembran nach wie vor rezidivfrei. Zum gleichen Zeitpunkt zeigten 34,9 % der Patienten mit mittlerer EGFR-Expression keine Anzeichen für ein Rezidiv, bei hoher EGFR-Expression in der Zellmembran waren 46,64 % der Patienten frei von

Rezidiven. Damit zeigte sich ein potentieller Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Expressionsausmaß des EGFR in der Zellmembran und dem rezidivfreien Überleben ($p = 0,065$). Die graphische Darstellung dieser Daten findet sich in Abbildung 26.

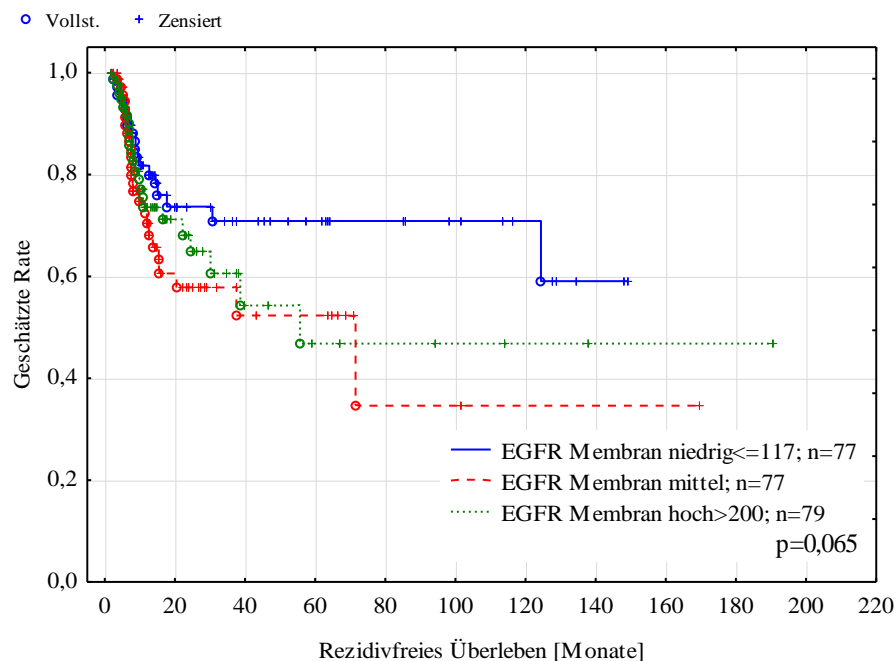


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Schätzer für das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression in der Zellmembran

Unter Betrachtung der lokoregionären Kontrolle bei niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zellkern wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Subgruppen festgestellt ($p = 0,65$). Auch bei einer Expression von SGLT1 im Zytoplasma bezogen auf das rezidivfreie Überleben wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p = 0,82$) (vgl. Abbildung 95 und 96 im Anhang).

3.7.4 Expression der molekularen Gewebemarker bezogen auf das Gesamtüberleben

Die Überlebenszeitanalysen des Gesamtüberlebens bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zellkern sind in Abbildung 97 im Anhang wiedergegeben.

Nach sieben Jahren lebten noch 14,89 % der Patienten mit niedriger, 17,04 % der Patienten mit mittlerer und 14,46 % der Patienten mit hoher Expression des Markers im Zellkern ($p = 0,2$).

Unter Betrachtung der p53-Expression im Zytoplasma zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens ($p = 0,024$). Nach sieben Jahren lebten noch 14,01 % der Patienten mit niedriger Expression. Von den Patienten mit hoher p53-Expression im Zytoplasma lebten nach sieben Jahren noch 21,16 %. Patienten mit mittlerer p53-Expression im Zytoplasma zeigten zu diesem Zeitpunkt im Vergleich das kürzeste Gesamtüberleben mit 10,57 %. (vgl. Abbildung 27).

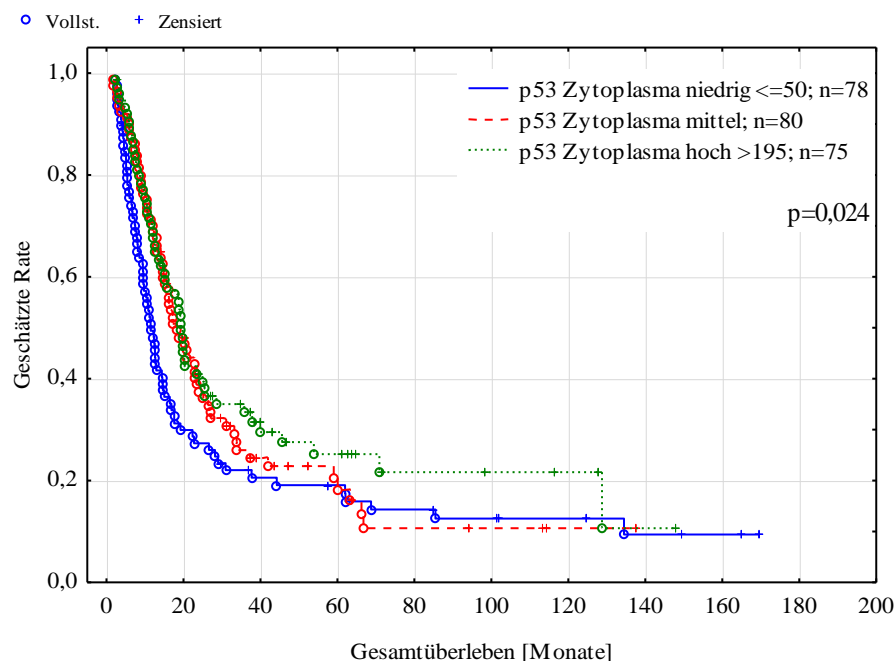


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamtüberleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zytoplasma

Abbildung 98 und 99 im Anhang zeigen die Kaplan-Meier-Analysen des Gesamtüberlebens bei Patienten mit EGFR-Expression im Nukleus bzw. im Zytoplasma. Eine niedrige, mittlere und hohe Expression des EGFR im Zellkern zeigte sich ohne statistisch signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p = 0,72$). Auch bei unterschiedlich hoher EGFR-Expression im Zytoplasma konnte das Signifikanzniveau nicht erreicht werden ($p = 0,22$).

Im Vergleich dazu zeigten Patienten mit mittlerer und hoher EGFR-Expression in der Zellmembran ein statistisch signifikant verkürztes Gesamtüberleben ($p = 0,036$). Nach sieben Jahren waren 11,45 % bei Patienten mit mittlerer und 7,59 % mit hoher EGFR-Expression in der Zellmembran noch am Leben. Zum gleichen Zeitpunkt lebten noch 26,91 % der Patienten mit niedriger EGFR-Expression. Die graphische Darstellung dieser Daten findet sich in Abbildung 28.

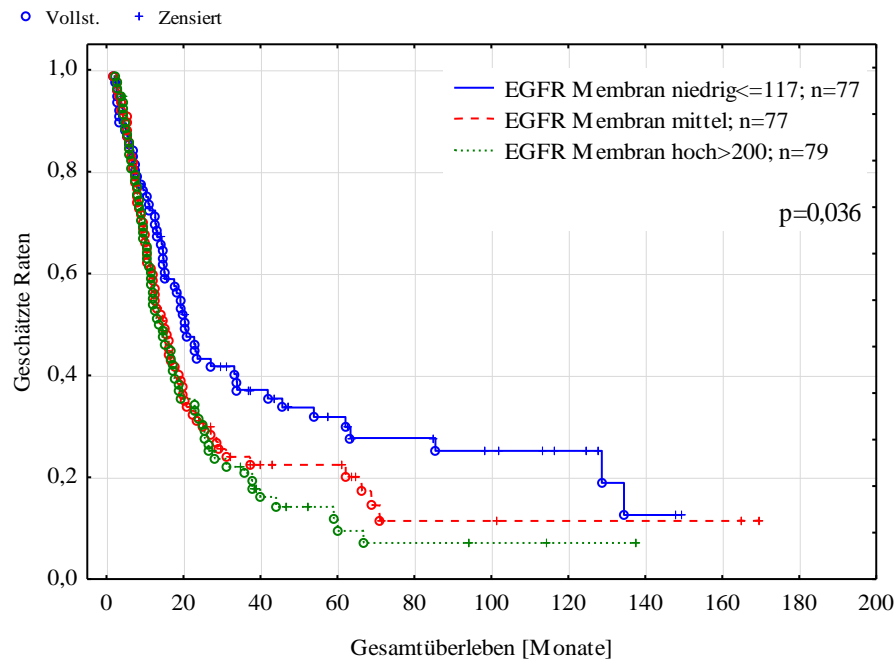


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamtüberleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression in der Zellmembran

In Abbildung 100 und 101 im Anhang sind die Überlebenszeitanalysen der Patienten mit SGLT1-Expression im Zellkern und Zytoplasma dargestellt. In beiden Fällen konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang der SGLT1-Expression in Bezug auf das Gesamtüberleben festgestellt werden ($p = 0,6$ und $p = 0,44$).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Studie wurden prätherapeutisch entnommene Biopsate von insgesamt 233 Patienten mit lokal fortgeschrittenem, inoperablem Kopf-Hals-Tumor immunhistochemisch aufgearbeitet und die Expression von p53, EGFR und SGLT1 im Tumorgewebe semiquantitativ analysiert.

Anhand der anamnestisch und im Verlauf der Therapie erhobenen Patientendaten wurde diese Auswertung in Bezug zu den Nebenwirkungen und dem Outcome der primären Radio(chemo)therapie gesetzt.

4.1 Expression und Korrelation der molekularen Gewebemarker

4.1.1 p53-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl eine p53-Expression im Zellkern als auch im Zytoplasma mithilfe des monoklonalen Antikörpers DO-7 detektiert. 93,13 % der Tumorbiopsien waren p53-positiv. Referenzwerte in der Literatur variieren zwischen 55 % und 68 % bzw. einer heterogenen Expression im gesamten Tumorkollektiv (Friedmann et al. 2001; Hirvikoski et al. 1997; Pukkila et al. 2002). Dies mag daran liegen, dass zum Teil einzelne Tumorlokalisationen gesondert untersucht wurden bzw. dass eine zytoplasmatische Färbung nicht eingeschlossen wurde. Einige Autoren nehmen in ihren Studien ausschließlich Bezug auf eine nukleäre Lokalisation (Awwad et al. 1996; Friedmann et al. 2001; Kumar et al. 2008b). Jedoch wurde auch eine zytoplasmatische Akkumulation des Proteins bereits im Rahmen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs beschrieben (Field et al. 1991). Unter Verwendung des DO-7 Antikörpers beschrieben Hirvikoski et al. eine zytoplasmatische Färbung in 20 % der untersuchten Larynxkarzinome, Pukkila et al. beobachteten dies in 45 % der untersuchten Pharynxkarzinome (Hirvikoski et al. 1997; Pukkila et al. 2002).

Eine zytoplasmatische Expression ist nicht gleichzusetzen mit einer Inaktivierung des Proteins in Tumoren. Neuroblastom-Zellen zeigten keine Beeinflussung der p53-vermittelten Funktionen trotz Verlagerung des wtp53 in das Zytoplasma (Goldman et al. 1996). Jansson et al. zeigten bei einer Untersuchung an kolorektalen Karzinomen, dass eine zytoplasmatische Akkumulation mit ähnlichen Mutationen wie die nukleäre Überexpression verbunden war (Jansson et al. 2001).

4.1.2 EGFR-Expression

Bei einer Vielzahl der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs zeigt sich eine Überexpression des EGFR (Santini et al. 1991).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein immunhistochemischer Ansatz gewählt, um die Proteinexpression des EGFR zu bestimmen, da die Überexpression des Rezeptors nicht immer auch mit einer Amplifikation des EGFR-Gens einhergeht (Grandis und Tweardy 1993). Es zeigte sich eine Anfärbarkeit im Zellkern, im Zytoplasma und in der Zellmembran. 96,14 % der Tumorproben waren EGFR-positiv. Damit liegt die EGFR-Expression leicht über den mit 80-90 % angegebenen Literaturwerten (Dassonville et al. 1993).

Viele Studien konzentrieren sich in ihren Untersuchungen auf die physiologische Expression des Rezeptors in der Plasmamembran (Bentzen et al. 2005; Eriksen et al. 2004; Grandis et al. 1996).

Zum Teil wurde auch eine primäre Lokalisation des Rezeptors im Zytoplasma der Zelle beschrieben, was in Zusammenhang mit dynamischen Abbau- und Recycle-Prozessen des Rezeptors stehen könnte (Aebersold et al. 2002).

Im Zellkern lokalisiert, fungiert der EGFR als transkriptioneller Regulator durch Bindung an die Promotoren von Cyclin D1, iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), B-Myb und COX-2 (Hanada et al. 2006; Hediger et al. 1987; Lin et al. 2001; Lo et al. 2010; Lo et al. 2005). Sowohl Bestrahlung als auch Cisplatin können die Translokation des Rezeptors in den Zellkern induzieren (Dittmann et al. 2005).

Der EGFR übernimmt im Zellkern außerdem auch direkte Aufgaben im Rahmen von DNA-Reparaturprozessen. Zellen, deren nukleäre EGFR-Expression aufgrund von Mutationen, die den Transport in den Nukleus einschränken, beeinträchtigt ist, zeigen eine reduzierte Fähigkeit DNA-Strangbrüche nach Bestrahlung oder Behandlung mit Cisplatin zu reparieren (Liccardi et al. 2011). Im Fibroblasten-Modell waren Zellen, die EGFR im Zellkern überexprimierten, mit der DNA-Proteinkinase assoziiert, die in Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen involviert ist, und reagierten resistent gegenüber Cisplatin. Auch als Reaktion auf Bestrahlung kommt es zu einer gesteigerten Assoziation und Stabilisation mit der DNA-Proteinkinase (Dittmann et al. 2005). Weitere Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der nukleäre EGFR auch durch Modulation der Chromatinbindungen eine Resistenz gegenüber Bestrahlung vermittelt (Dittmann et al. 2011).

4.1.3 SGLT1-Expression

Unter physiologischen Umständen ist die Expression des SGLT1 auf intestinale und renale Zellen sowie endotheliale Zellen der Blut-Hirn-Schranke begrenzt. Um genügend Energie für ein gesteigertes Zellwachstum zu gewährleisten, zeigen auch Krebszellen eine veränderte Expression des SGLT1 im Rahmen einer gesteigerten Glukoseaufnahme und Glykolyse. Jedoch ist die Datenlage zur Expression dieses Transporters bei humanen Karzinomen nach wie vor begrenzt.

77,69 % der Tumorbiopsien in der vorliegenden Arbeit waren SGLT1-positiv. Dieses Ergebnis ist niedriger als die Untersuchungen von Tumorbiopsien des Kopf-Hals-Bereichs durch Helmke et al., die eine SGLT1-positive Anfärbbarkeit in 90 % der untersuchten Proben beschrieben (Helmke et al. 2004). Obwohl es sich bei SGLT1 um einen membranständigen Transporter handelt, fanden sich sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Färbemuster in der vorliegenden Studie. Eine solche vorwiegend zytoplasmatische Expression des Transporters beschrieben auch Kipp et al. bei der Untersuchung von Caco-2-Zellen (Kipp et al. 2003).

Welche Rolle der Transporter im Zellkern spielen könnte, lässt Raum für Hypothesen. Eine ähnliche Expression wurde bislang nur im Rahmen von Prostata-Karzinomen beschrieben. Blessing et al. beobachteten eine membranöse und zytoplasmatische SGLT1-Expression bei low grade-Prostata-Karzinomen, wohingegen high grade-Karzinome eine Anfärbung der inneren Kernmembran aufwiesen (Blessing et al. 2012). Die Autoren vermuten eine Translokation des Transporters in den Zellkern im Rahmen des tumorösen Geschehen ähnlich wie bei dem EGFR unter Beeinflussung der Tumoraggressivität.

Ergebnisse bislang unveröffentlichter Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Klaus Dittmann aus der Abteilung für Radioonkologie der Universität Tübingen könnten eine mögliche Erklärung für die Kernlokalisation liefern: Bilder der konfokalen Mikroskopie zeigen eine Co-Lokalisation des SGLT1 mit Lamin A in der inneren Kernmembran (Prof. K. Dittmann, pers. Mitteilung November 2013). Bei Lamin A handelt es sich um einen Vertreter einer Gruppe von Filamentproteinen, der sog. Lamine. Lamin A hat strukturelle und funktionelle Bedeutung für den Zellkern. Durch Bindung an Histone, DNA und Polynukleosome wird Lamin A eine regulatorische Rolle bei der Organisation des Heterochromatins zugesprochen (Mattout et al. 2007; Stierlé et al. 2003; Yuan et al. 1991).

Dieselbe Forschungsgruppe beobachtete auch die Aufnahme von radioaktivmarkierter Glukose in den Zellkern (Prof. K. Dittmann, pers. Mitteilung November 2013). SGLT1 wird an der Zellmembran an einer spezifischen Bindungsstelle mit Glukose beladen. Intrazellulär findet sich der Transporter in Mikrotubuli-assoziierten Vesikeln (Kipp et al. 2003). Möglicherweise gelangt der mit Glukose beladene Transporter stressinduziert im Rahmen des tumorösen Geschehens in den Zellkern. Da auch die Enzyme der Glykolyse im Zellkern vorhanden sind (Siebert 1961), könnte es dort unter Stress sowohl zur Speicherung von Glukose als auch, aufgrund des erhöhten ATP-Bedarfs z.B. im Rahmen von DNA-Reparaturprozessen, zum direkten Verbrauch von Glukose kommen.

4.1.4 Korrelation der molekularen Gewebemarker

Die nukleäre p53-Expression zeigte eine positive Korrelation sowohl zu der SGLT1-Expression im Zellkern ($r = 0,193$, $p = 0,0031$) als auch zu der zytoplasmatischen Expression von SGLT1 ($r = 0,22$, $p = 0,0008$). Auch die p53-Expression im Zytoplasma korrelierte mit der SGLT1-Expression im Zytoplasma ($r = 0,2199$; $p = 0,00072$). Eine Erklärung für einen möglichen Zusammenhang der Expressionen liefert die Literatur bislang nicht. Casneuf et al. konnten bei der Untersuchung von Adenokarzinomen des Pankreas keinen korrelativen Zusammenhang zwischen diesen beiden molekularen Markern feststellen (Casneuf et al. 2008). Jedoch greift p53 direkt und indirekt in unterschiedliche Schritte des Metabolismus der Krebszellen ein.

Nach Aktivierung beeinflusst p53 sowohl die Glykolyse als auch die oxidative Phosphorylierung. Wtp53 kann die Transkription der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 hemmen und so zu einer verringerten Glukoseaufnahme führen (Schwartzberg-Bar-Yoseph et al. 2004). Eine negative Regulierung der zellulären Glykolyse durch wtp53 erfolgt über die Transkription von TIGAR (TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator), einem Inhibitor der Fruktose-2,6-Bisphosphatase (Bensaad et al. 2006). Der Pentosephosphatweg zur Energiegewinnung für biosynthetische Prozesse wird durch zytoplasmatisches p53 gehemmt, indem es die Dimerisierung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu einem aktiven Holoenzym blockiert (Jiang et al. 2011). Über die Transkription von SCO2 (Synthesis of Cytochrome C Oxidase 2), einem direkten p53-Target, wird die

oxidative Phosphorylierung als mitochondrialer Weg zur Energiegewinnung verstärkt (Matoba et al. 2006).

Dysfunktionales p53 bzw. ein loss of function in Krebszellen kann zu einer ineffizienten mitochondrialen Respiration führen, was wiederum zu einer Verlagerung der ATP-Gewinnung von oxidativer Phosphorylierung zu Glykolyse führt.

Zwischen EGFR und SGLT1 scheint ein komplexes Zusammenspiel im Rahmen des tumorösen Geschehens zu bestehen. Eine Steigerung der Glukosekonzentration kann in einer Aktivierung des EGFR resultieren (Han et al. 2011). Bei Prostatakarzinomen wurde in den EGFR-positiven Gewebeproben eine Co-Lokalisation des SGLT1 in den Krebszellen beobachtet (Ren et al. 2013).

Der Korrelationskoeffizient zwischen der EGFR-Expression in Zellmembran und der nukleären SGLT1-Expression betrug in der vorliegenden Arbeit 0,207 ($p = 0,0015$).

Bei der Untersuchung oraler Plattenepithelkarzinome zeigte sich ein positive Korrelation zwischen beiden Markern (Pearsons Korrelation Koeffizient = 0,89, $p = 0,016$) (Hanabata et al. 2011). Dies konnte bei kolorektalen Karzinomen nicht nachgewiesen werden ($p = 0,67$) (Guo et al. 2011).

Für die Plausibilität einer gemeinsamen Expression sprechen die Ergebnisse von Weihua et al., die zeigten, dass die SGLT1-Expression und Transportaktivität durch den EGFR beeinflusst werden (Weihua et al. 2008). Eine Blockade des EGFR durch siRNA resultierte in einem vermehrten Abbau und einer Abnahme der SGLT1-Expression. Die Interaktion beider Proteine gewährleistete die intrazelluläre Glukosekonzentration und verhinderte die Autophagie der Zellen bei niedriger Glukose-Konzentration. Nach Knockdown des EGFR kam es zur Apoptose der Zellen, der Inhibitor der EGFR-Kinaseaktivität AEE788 erzielte jedoch nicht denselben Effekt. Auch die Interaktion zwischen EGFR und SGLT1 zeigte sich unbeeinflusst durch den Tyrosinkinase-Inhibitor und damit anscheinend unabhängig von der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR. Ausschlaggebend für das Zusammenspiel scheint vielmehr die Autophosphorylierungsdomäne des EGFR zu sein (Ren et al. 2013).

Gleichzeitig wurde unter Inhibition der Tyrosinkinase durch AEE788 und Erlotinib nach Bestrahlung eine deutliche Reduktion der Glukoseaufnahme beobachtet (Huber et al. 2012; Weihua et al. 2008). Die Autoren sahen eine mögliche Erklärung darin,

dass die SGLT1-vermittelte Glukoseaufnahme unter Ruhebedingungen unabhängig von der Tyrosinkinaseaktivität ist, unter Stress und als Reaktion auf Wachstumssignale jedoch nicht (Huber et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine positive Korrelation zwischen der p53-Expression im Zellkern und der Expression des EGFR in der Zellmembran beobachtet ($r = 0,2485$, $p = 0,00013$).

Aus früheren Studien geht hervor, dass interessanterweise sowohl der wtp53 als auch mutierte Formen als Aktivatoren der EGFR-Transkription fungieren können (Deb et al. 1994; Ludes-Meyer et al. 1996; Sheikh et al. 1997). Dies wird ergänzt durch die Ergebnisse einer Studie von Bheda et al., die durch Untersuchungen an humanen Keratinozyten herausfanden, dass wtp53 in niedriger Konzentration eine Hemmung des EGFR-Promotors induziert und in hohen Konzentrationen eine Aktivierung bewirkt (Bheda et al. 2008). Dabei scheint p53 sowohl direkt über Bindungsstellen am Promoter als auch indirekt, unter anderem vermittelt durch Transkriptionsfaktoren wie Yin Yang 1 und Sp1, die Transkription des EGFR zu beeinflussen.

4.2 Expression der molekularen Gewebemarker beim Auftreten von Nebenwirkungen der primären Radio(chemo)therapie

Aufgrund einer Verbesserung des Gesamtüberlebens und der lokoregionären Kontrolle ist die konkominante Radiochemotherapie mittlerweile Standardtherapie bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren. Gleichzeitig mit der Verbesserung der Prognose steigt jedoch auch das Risiko für höhergradige (CTCAE ≥ 3), therapiebedingte Nebenwirkungen, welche die Effektivität der Therapie begrenzen.

Uni- und multivariante Analysen ergaben einen signifikanten Zusammenhang zwischen höhergradiger akuter Organtoxizität sowie dem Gesamtüberleben und der lokoregionären Kontrolle bei Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren (Wolff et al. 2010). Patienten mit höhergradiger akuter Organtoxizität (CTCAE ≥ 3) zeigten ein 5-Jahres-Überleben von 44 % im Vergleich zu 8 % bei Patienten ohne höhergradige akute Organtoxizität ($p < 0,01$). Die Ursachen dieser Zusammenhänge sind bislang noch unklar.

Die Daten dieser Arbeit zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von p53 im Zytoplasma sowie einen Trend für die Expression des EGFR

im Zellkern und dem Auftreten von organotoxischen Nebenwirkungen in Form von Dysphagie ($p = 0,015$ bzw. $p = 0,099$). Eine nukleäre EGFR-Expression zeigte außerdem einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten von Übelkeit unter der Therapie ($p = 0,046$).

Es gelang jedoch nicht, einen Zusammenhang zwischen der Expression von p53, EGFR bzw. SGLT1 in den unterschiedlichen Zellkompartimenten und dem Auftreten von zusammengefasster höhergradiger Hämatotoxizität, Organotoxizität und Gesamtoxizität nachzuweisen.

Ergebnisse aus Tiermodellen lassen vermuten, dass zumindest p53 auch hier eine essentielle Rolle spielt. Genotoxischer Stress führt zu einer p53-abhängigen Apoptose, besonders in Organen, welche sensibel für ionisierende Strahlen sind: hämatopoetische Zellen, Haarfollikel und epitheliale Zellen des Interstitiums.

Eine pharmakologische Blockade des wtp53 durch sog. *small molecules* nach Radiatio mit 6 bis 11 Gy bewirkte eine Reduktion der bestrahlungsbedingten Letalität (Komarov et al. 1999).

p53-Knockout-Mäuse zeigten sich resistent gegenüber Bestrahlungsdosen, die normalerweise nach 12 bis 20 Tagen zum Tod durch Knochenmarksdepletion, dem sog. hämatopoetischen Syndrom, führen würden (Westphal et al. 1997). Botchkarev et al. beobachteten außerdem einen p53-abhängigen Haarausfall nach experimenteller Chemotherapie (Botchkarev et al. 2000).

Interessanterweise zeigte sich jedoch bei Knockout-Mäusen nach höherdosierter Bestrahlung ($> 12,5$ Gy) eine schnellere Entwicklung schwerer Schäden des Gastrointestinaltraktes (Komarova et al. 2004). Dies geht vermutlich auf den p53-vermittelten Wachstumsstopp zurück, der verhindert, dass es zur mitotischen Katastrophe kommt.

Studien, die solche Ergebnisse auf humane Zellen übertragen lassen, stehen derzeit noch aus. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von p53 und dem Auftreten höhergradiger Nebenwirkungen herstellen zu können, sind daher weitere detaillierte Untersuchungen notwendig.

Auch zu SGLT1 und EGFR fehlen bislang klinische Ergebnisse, die einen Zusammenhang zwischen der Expression und möglichen Nebenwirkungen der Therapie beschreiben.

Dass die Expression des EGFR eine prognostische Rolle für das Auftreten von Nebenwirkungen einer Radio(chemo)therapie spielen könnte, lässt sich nur indirekt

aus der Betrachtung von Studien über EGFR-Inhibitoren schließen. EGFR-Inhibitoren, wie der monoklonale Antikörper Cetuximab in Kombination mit Bestrahlung, sorgen für eine bessere Tumorkontrolle und verbessertes Gesamtüberleben (Bonner et al. 2006). Ein weiterer Vorteil wäre eine Reduktion der systemischen Nebenwirkungen im Vergleich zu Chemotherapeutika.

Bei der Kombination aus EGFR-Inhibitoren und Radiotherapie steigt jedoch das Risiko dermatologischer Nebenwirkungen (Tejwani et al. 2009). Die Metaanalyse von 75 Studien ergab gesteigerte Risiken für Strahlendermatitis (RR 2,39; $p < 0,001$), Ausschlag (RR 3,1; $p < 0,001$) und Mukositis (RR 1,8; $p < 0,001$) bei einer kombinierten Therapie im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung.

Die Inhibitoren scheinen möglicherweise sowohl in Tumor- als auch gesundem Gewebe eine Strahlensensibilisierung zu vermitteln. Ein möglicher Umkehrschluss aus diesen Ergebnissen wäre eine „protektive“ Rolle des EGFR vor allem vor den dermatologischen Nebenwirkungen einer Radio(chemo)therapie. Ergebnisse experimenteller Studien deuten daraufhin, dass SGLT1, vor allem durch eine verstärkte Aufnahme von Glukose als Antwort auf genotoxischen Stress, den EGFR in dieser protektiven Funktion unterstützt (Prof. K. Dittmann, pers. Mitteilung November 2013). Jedoch stehen Ergebnisse aus klinischen Studien dazu noch aus.

4.3 Therapieergebnisse nach primärer Radio(chemo)therapie

Die 3- und 5-Jahres-Überlebensrate für das gesamte Patientenkollektiv betrug 30,71 % bzw. 22,08 % bei einem medianen Follow-up von 13,1 Monaten. Zu diesen Zeitpunkten waren 63,04 % bzw. 58,56 % der Patienten rezidivfrei. Damit stimmen die Daten dieser Arbeit mit entsprechenden, in der Literatur angegebenen Werten überein, wo die 5-Jahres-Überlebens- bzw. lokoregionäre Kontrollraten mit 24 bis 41 % und 31 bis 67 % angegeben sind (Adelstein und Leblanc 2006; Suntharalingam et al. 2001).

4.3.1 Einfluss von p53 auf das klinische Outcome einer primären Radio(chemo)therapie

Bei der Untersuchung von 123 Patienten mit Oro- und Hypopharynxkarzinomen (50 % UICC IV, 44 % RT) zeigte sich in univarianten Analysen erstmalig ein Zusammenhang zwischen einer zytoplasmatischen p53-Expression und einem schlechteren Gesamtüberleben ($p = 0,04$) (Pukkila et al. 2002). In multivarianten

Analysen konnte die p53-Expression jedoch nicht als unabhängiger prognostischer Parameter verifiziert werden.

Bei Betrachtung der Proteinexpression im Zytoplasma zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation zu krankheitsfreiem Überleben, metastasenfreiem Überleben und dem Gesamtüberleben nach primärer Radiochemotherapie ($p = 0,0057$, $p = 0,017$ und $p = 0,024$). In Bezug auf das rezidivfreie Überleben fand sich eine potentielle Korrelation ($p = 0,087$).

Ein solcher Zusammenhang konnte zwischen der Proteinexpression im Zellkern und den gleichen Überlebensendpunkten in dieser Arbeit nicht hergestellt werden. Diese unterschiedlichen Ergebnisse spiegeln sich auch in den kontroversen Ergebnissen der Literatur wider.

Häufig wird eine p53-Überexpression (sowie TP53-Mutationen) mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben und kürzeren Gesamtüberleben in Verbindung gebracht (Sauter et al. 1995; Vielba et al. 2003).

Aufgrund seiner Schlüsselrolle als „Wächter des Genoms“ konnten ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression von p53 und der zellulären Sensitivität für eine Radio- und/oder Chemotherapie beobachtet werden (Raybaud-Diogenè et al. 1997).

Im Gegensatz dazu stehen Studien, welche die prognostische Rolle von p53 im Rahmen des klinischen Outcomes infrage stellen und keinen Zusammenhang zwischen einer Überexpression des Proteins und dem Outcome unterschiedlicher Therapieregime herstellen konnten (Friedmann et al. 2001; Mineta et al. 1998).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der prognostischen Rolle von p53 legen die Hypothese nahe, dass Unterschiede in der Größe des Kollektivs sowie des Studiendesigns und bezüglich der Methodik eine Rolle spielen. Berücksichtigt werden muss auch die Tumorlokalisation. So zeigte sich in einer Studie zum Vergleich der p53-Veränderungen bei Tumoren im Bereich des Hypopharynx signifikant mehr Veränderungen in Form von Mutationen und Überexpressionen, Larynx Tumore wiesen im Vergleich die geringste Anzahl an Alterationen auf (Bosch et al. 2004).

Die in der Immunhistochemie gebräuchlichen Antikörper weisen sowohl den Wildtyp als auch das mutierte p53-Protein nach. Obwohl beide Formen dadurch immunhistochemisch nicht differenzierbar sind, hat der wtp53 eine sehr kurze

Halbwertszeit und sollte daher in normalem Gewebe durch die üblichen Antikörper nicht nachweisbar sein.

Durch Mutation, Veränderung des Abbauweges oder durch Bindung an virale Proteine kann es zu einem verlängerten Verbleib im Gewebe kommen und ein immunhistochemischer Nachweis ermöglicht werden. Die immunhistochemische p53-Detektion gilt daher allgemein als Alternative zum Nachweis der p53-Mutationen.

Zum Teil besteht eine Korrelation zwischen der Überexpression und der Mutation von p53 (Hall und Lane 1994). Trotzdem kodiert eine Mutation des TP53-Gens nicht immer für ein stabiles Protein. Nonsense- und Frameshift-Mutationen können auch zu fehlender Proteinbildung bzw. Bildung verkürzter Proteine führen. Daher bedeutet ein positives Färberesultat den Nachweis eines defekten Proteins in mutierter oder inaktiver Form. Ein negatives Färberesultat hingegen ist nicht mit einem Defekt oder Abwesenheit des Proteins gleichzusetzen, da z.B. fragmentierte Proteine der Antikörperdetektion entgehen.

Dies sollte bei der Interpretation und dem Vergleich immunhistochemischer Ergebnisse bedacht werden.

4.3.2 Einfluss des EGFR auf das klinische Outcome einer primären Radio(chemo)therapie

Je nach zellulärer Lokalisation des Rezeptors wurden divergierende Ergebnisse herausgearbeitet.

Bei Analyse der EGFR-Expression der Zellmembran in der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikante Korrelation zum Gesamtüberleben ($p = 0,036$) und ein Trend für die lokoregionäre Kontrolle nach Radio(chemo)therapie ($p = 0,065$).

Anhalt dafür, dass die Expression von EGFR eine aktive Rolle bezüglich des Ansprechens des Tumors auf die Radiotherapie spielt, liefern sowohl experimentelle als auch klinische Daten.

Sheridan et al. führten In-vitro-Untersuchungen an 14 Zelllinien von Kopf-Hals-Tumoren durch (Sheridan et al. 1997). Die Hemmung des Wachstums von Zellen mit hoher EGFR-Konzentration bei einer Bestrahlung mit 2 Gy erwies sich als weniger effektiv, während Zellen mit niedrigerer EGFR-Konzentration radiosensitiver reagierten.

Ergebnisse einer an Mäusen durchgeführten In-vivo-Studie legen nahe, dass ionisierende Strahlen eine Autophosphorylierung des Rezeptors und Aktivierung des Signalwege bewirken können (Akimoto et al. 1999). Da die strahleninduzierte Autophosphorylierung bei Tumoren mit einer hohen EGFR-Expression beobachtet wurde, scheint es sich um einen Vorgang zu handeln, der vom Ausmaß der Rezeptorexpression abhängig ist. Dies liefert einen möglichen Erklärungsansatz für ein aggressiveres Wachstumsverhalten von Tumoren mit erhöhter EGFR-Expression und bildet die Grundlage für Therapeutika, welche den Rezeptor selbst oder durch EGFR-vermittelte Funktionen hemmen.

In korrelativen Studien zeigte sich eine schlechtere Prognose sowie schlechtere lokoregionäre Kontrolle bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren nach Radio(chemo)therapie. Ang et al. untersuchten 2002 den Einfluss der EGFR-Expression auf das Überleben bei Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomen (Ang et al. 2002). 155 Patienten (30 % UICC III, 66 % UICC IV) wurden prätherapeutisch Biopsien entnommen und anschließend mit 70 Gy über insgesamt 7 Wochen behandelt. 95 % der mittels IHC untersuchten Proben zeigten eine Expression des Rezeptors. Die statistische Analyse hob EGFR als unabhängigen prognostischen Indikator für das Gesamtüberleben ($p = 0,0006$) und das krankheitsfreie Überleben ($p = 0,0016$) hervor. Außerdem erwies sich der EGFR auch als prädiktiver Faktor der lokoregionären Kontrolle ($p = 0,0031$), nicht jedoch für das Auftreten von Fernmetastasen ($p = 0,96$).

Hitt et al. beobachteten bei der Untersuchung von 46 Biopsien von Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren, die mit einer Induktionchemotherapie, bestehend aus 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel, behandelt wurden, eine Assoziation zwischen einer Rezeptor-Überexpression und einem kürzeren krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben (Hitt et al. 2005). Jedoch zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem EGFR-Status und dem Ansprechen auf die Chemotherapie.

Ähnliche Ergebnisse, die eine erhöhte EGFR-Expression in Zusammenhang mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben und verkürzten Gesamtüberleben bei unterschiedlichen therapeutischen Ansätzen beobachteten, finden sich auch in vorhergehenden Studien (Dassonville et al. 1993; Grandis et al. 1998; Maurizi et al. 1996; Nicholson et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Korrelation zwischen der Expression von EGFR im Zytoplasma und einzelnen prognosebestimmenden Parametern wie krankheitsfreiem Überleben, lokoregionärer Kontrolle und Gesamtüberleben festgestellt werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten auch Aebersold et al. (Aebersold et al. 2002). In dieser retrospektiven Studie zur Expression von EGFR (und TGF α) bei Patienten mit Oropharynxkarzinomen, die mit kurativer Radiotherapie behandelt wurden, fand sich keine Korrelation zwischen der Expression des EGFR, die hauptsächlich im Zytoplasma beobachtet wurde, und den Überlebensendpunkten.

Hoshino et al. untersuchten 52 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus bezüglich einer nukleären Expression von phosphoryliertem EGFR mittels IHC und Western Blot (Hoshino et al. 2007). Im Vergleich zur nichtphosphorylierten EGFR zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der nukleären, phosphorylierten Form des Rezeptors sowie dem Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen und vor allen Dingen einem schlechteren Outcome. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer nukleären Expression von EGFR und dem Outcome der Patienten.

In Zusammenschau stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die These, dass zumindest die Bestimmung der membranösen EGFR-Expression zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein sinnvoller Parameter zur Identifizierung von Patienten ist, die möglicherweise ein schlechteres Ansprechen auf die Radio(chemo)therapie zeigen und von einem aggressiveren Therapieansatz profitieren könnten.

4.3.3 Einfluss des SGLT1 auf das klinische Outcome einer primären Radio(chemo)therapie

Wie unter 4.1.4 detaillierter beschrieben, wiesen Weihua et al. eine Steigerung der SGLT1 Proteinkonzentration und seiner Transporteraktivität durch Stabilisierung des Transporters via EGFR nach (Weihua et al. 2008).

Aufgrund der Tatsache, dass der EGFR bei Tumoren epithelialen Ursprungs häufig überexprimiert wird, könnte daher auch SGLT1 in EGFR-positiven Tumoren überexprimiert sein.

Die Ergebnisse der Forschungsgruppe rund um Helmke zur SGLT1-Expression in (prä)malignen Geweben des Kopf-Hals-Bereichs stützen diese Hypothese (Helmke et

al. 2004). Immunhistochemische Untersuchungen ergaben in 27 von 30 untersuchten Tumorgeweben ein SGLT1-positives Färberesultat. Sowohl die Analyse auf mRNA-Ebene als auch die immunhistochemischen Färbungen zeigten außerdem eine auf gutdifferenzierte Tumorbereiche begrenzte Expression des Transporters. Auch in Normalgewebe war die Expression auf differenzierte Zellen beschränkt, dysplastische Areale zeigten dagegen keine Anfärbung.

Bei der Untersuchung zur Expression und prognostischen Aussagekraft von Glukosetransporten bei Plattenepithelkarzinomen der Tonsillen und Zunge kamen Deron et al. zu einem ähnlichen Ergebnis: Hier war eine SGLT1-Überexpression hauptsächlich in gutdifferenzierten Tumorteilen zu beobachten (Deron et al. 2011).

SGLT1 könnte somit eine Rolle als prognostischer Marker bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs spielen.

Die Daten dieser Arbeit konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression des SGLT1 und dem Outcome der Patienten nach Radio(chemo)therapie herausarbeiten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit zwei anderen Studien:

Deron et al. konnten keine prognostische Aussagekraft für die SGLT1-Expression bei Plattenepithelkarzinomen der Tonsillen und Zunge feststellen (Deron et al. 2011), jedoch wurde immunhistochemisch eine verstärkte Expression des Transporters bei Karzinomen der Tonsillen im Vergleich zu den aggressiveren Zungenkarzinomen beobachtet.

Guo et al. stellten in einer Studie der SGLT1-Expression (sowie EGFR-Expression) bei kolorektalen Karzinomen eine positive Korrelation zwischen der SGLT1-Expression und dem klinischen Stadium fest; je fortgeschrittener das Tumorstadium, desto höher war die SGLT1-Expression (Guo et al. 2011). Es zeigte sich außerdem ein möglicher Zusammenhang zwischen der SGLT1-Expression und dem Ansprechen auf eine first-line Chemotherapie, wohingegen keine Korrelation zu Krankheitskontrolle, krankheitsfreiem Überleben und Gesamtüberleben hergestellt werden konnte.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse einer prospektiven Studie zur Expression von SGLT1, Bcl-2 und p53 in 83 Resektaten von Adenokarzinomen des Pankreas (Casneuf et al. 2008). In univarianten Analysen zeigten Patienten mit niedriger SGLT1-Expression ein kürzeres Gesamtüberleben (17,1 Monate) als Patienten mit hoher SGLT1-Expression (24,7 Monate; $p = 0,041$). In multivarianten Analysen konnte ein Trend für die Expression des SGLT1 bezogen auf das Gesamtüberleben

nachgewiesen werden ($p = 0,071$). Sowohl in uni- als auch multivarianten Analysen zeigte sich außerdem eine signifikante Korrelation zwischen der Expression des SGLT1 und dem krankheitsfreien Überleben: Das längste mediane krankheitsfreie Überleben (45,6 Monate) zeigten junge Patienten ($\leq 63,9$ Jahre) mit hoher SGLT1-Expression ($p = 0,022$). Zusätzlich zeigte sich eine Korrelation zwischen einer hohen Expression von SGLT1 und einer hohen Bcl-2-Expression. Ein solcher Zusammenhang konnte zwischen der Expression des SGLT1 und p53 nicht hergestellt werden. Obwohl Studien mit sensitiveren Techniken noch ausstehen, implizieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es sich bei SGLT1 (und Bcl-2) um prognostische Marker bei Adenokarzinomen des Pankreas handeln könnte.

Schlussendlich konnte in der vorliegenden Arbeit, ergänzend zu den Ergebnissen von Helmke et al., die Expression des SGLT1 im Gewebe lokal fortgeschrittener Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen werden (Helmke et al. 2004). Im Gegensatz zu einem Teil der oben genannten Studien gelang es jedoch nicht, dieses Ergebnis in einen Zusammenhang mit dem Outcome von Patienten zu bringen, welche mittels primärer Radio(chemo)therapie behandelt wurden. Die Rolle des aktiven Glukose-Transporters im Rahmen der Diagnostik und Behandlung der Kopf-Hals-Tumoren bleibt daher nicht abschließend geklärt und erfordert weitere klinische und experimentelle Betrachtung.

4.4 Ausblick und Problematik

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten nicht darauf hin, dass die Expression von p53, EGFR oder SGLT1 die Ausbildung höhergradiger Nebenwirkungen unter einer Radio(chemo)therapie signifikant beeinflusst. Die Ergebnisse bezüglich des Outcomes einer Radio(chemo)therapie stützen bisherige Literaturergebnisse, dass p53 und EGFR eine prognostische Rolle spielen.

Um ausgehend von dieser Arbeit den Einfluss dieser Gewebemarker detaillierter zu untersuchen bzw. präziser ausschließen zu können, sind weiterführende Studien sinnvoll, die u.a. auch andere Gewebemarker beleuchten.

Gerade SGLT1 ist in Hinblick auf eine Expression bei Kopf-Hals-Tumoren bislang noch kaum untersucht, obwohl es Hinweise auf eine vermehrte Expression bei Steigerung des EGFR gibt (Weihua et al. 2008).

Welche Methodik zur Identifizierung molekularer Marker bei Kopf-Hals-Tumoren am sinnvollsten erscheint, wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Die Immunhistochemie hat sich unter Anwendung kommerzieller Antikörper zu einer Standardmethode im klinisch-pathologischen Alltag entwickelt. Gerade im Hinblick auf prätherapeutische Verfahren erscheint dies durchaus sinnvoll. Unter Berücksichtigung der Durchführbarkeit und Kosten ist es ein verhältnismäßig leicht reproduzierbares Verfahren. Trotzdem bergen sowohl die Standardisierung der Antikörperpräparation und Detektion als auch das Scoring-System Probleme, die hauptsächlich die Gewährleistung konstanter und vergleichbarer Ergebnisse betreffen.

Diese Tatsache und heterogene Patientenkollektive bezüglich Tumorlokalisierung und Therapieschemata erschweren einen direkten Vergleich mit anderen Studien.

Die klinische Relevanz dieses Themas in Bezug auf eine interindividuelle Optimierung der Radio(chemo)therapie sollte jedoch genügend Anlass bieten, die Grundlagen des Zusammenhangs von Nebenwirkungen und Outcome weiterführend zu erforschen.

5 Zusammenfassung

Aufgrund des meist fortgeschritteneren Stadiums zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und der hohen Rezidivrate stellen Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs nach wie vor eine therapeutische Herausforderung dar. Trotz multimodaler Therapieansätze bleibt das Überleben von Patienten mit lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren verhältnismäßig schlecht. Zum Zeitpunkt der Diagnose befinden sich bereits 50-60 % der Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien.

Bei diesen Tumoren der UICC-Stadien III und IV werden Morbidität und Mortalität vor allen Dingen durch die lokoregionäre Kontrolle bestimmt. Die Prognose hängt hauptsächlich von T- und N-Stadium ab, wobei letzteres bislang ausschlaggebender Prognosefaktor der lokoregionären Kontrolle ist (Spector et al. 2001).

Momentan sind verlässliche Aussagen darüber, welche Tumoren mit vergleichbarer Größe und Lokalisation erfolgreich therapiert werden können und welche nicht, allein auf Basis klinisch-pathologischer Daten nicht möglich. Genauso wenig lassen sich bislang Aussagen über das Auftreten und das Ausmaß therapiebedingter Nebenwirkungen anhand molekularer Faktoren treffen, obwohl diese sowohl subjektiv als auch objektiv den Therapieerfolg entscheidend beeinflussen können. Die Identifizierung verlässlicher Gewebemarkers, welche die Tumoraggressivität adäquat widerspiegeln, könnte daher bei der Auswahl und Anpassung des jeweiligen Therapieregimes von Nutzen sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde retrospektiv ein Kollektiv von 233 Patienten untersucht, welche im Zeitraum zwischen 1994 und 2011 in der UMG aufgrund eines inoperablen Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereichs eine primäre Radio(chemo)therapie erhielten. Dazu wurden die prätherapeutisch entnommenen Tumorproben jeweils bezüglich ihrer Expression von p53, EGFR und SGLT1 immunhistochemisch aufgearbeitet und in Bezug auf das Patientenkollektiv analysiert. Ziel war die Untersuchung einer Korrelation zwischen diesen Gewebemarkern und höhergradigen Nebenwirkungen unter Radio(chemo)therapie einerseits sowie dem Outcome der Therapie andererseits.

93,13 % der untersuchten Tumorproben waren p53-positiv, wobei sowohl ein nukleäres als auch ein zytoplasmatisches Färbemuster beobachtet wurde. EGFR-positive Tumoren (nukleär, zytoplasmatisch und membranös) fanden sich bei 96,14 % der Patienten. 77,69 % der Biopsien zeigten eine SGLT1-positive

Anfärbbarkeit in Zellkern und Zytoplasma. Außerdem konnten statistisch signifikante Korrelationen der einzelnen Marker nachgewiesen werden: So zeigten sich positive Korrelationen zwischen p53 im Zellkern und EGFR in der Zellmembran, SGLT1 im Zellkern bzw. im Zytoplasma. Auch die membranöse EGFR-Expression korrelierte mit der nukleären SGLT1-Expression.

Die Daten lieferten keinen Hinweis auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang der Expression der untersuchten Marker p53, EGFR und SGLT1 und dem Auftreten höhergradiger Nebenwirkungen einer primären Radio(chemo)therapie. Zwar zeigte sowohl die p53-Expression im Zytoplasma als auch die nukleäre EGFR-Expression eine Korrelation mit der Ausbildung von Schluckbeschwerden (Dysphagie Grad 0 bis 3) und auch Übelkeit Grad 0 bis 2 zeigte eine unterschiedliche Ausprägung bezogen auf die nukleäre EGFR-Expression. Jedoch konnte diese Signifikanz nicht auf die zusammengefassten höhergradigen, hämatotoxischen oder organotoxischen Nebenwirkungen sowie die Gesamttoxizität übertragen werden.

Bislang fehlen vergleichbare Studien, die diese klinisch relevante Fragestellung näher beleuchten. Dagegen liefert die Literatur zahlreiche Studien, die das Outcome unterschiedlicher Therapieregime unter Berücksichtigung der p53- und EGFR-Expression analysieren. Auch erste Ergebnisse bezüglich des SGLT1 bei bösartigen Neubildungen liegen vor. Viele Ergebnisse deuten auf eine prognostische Rolle von p53 und EGFR im Rahmen von Kopf-Hals-Tumoren hin. Auch Teilergebnisse dieser Arbeit stützen diese Hypothese. So konnte für die p53-Expression im Zytoplasma eine weitgehend statistisch signifikante Korrelation mit allen untersuchten Parametern des Outcomes (krankheitsfreies Überleben, rezidivfreies Überleben, metastasenfreies Überleben und Gesamtüberleben) festgestellt werden. Es zeigte sich außerdem eine Beeinflussung der lokoregionären Kontrolle und des Gesamtüberlebens durch eine membranöse EGFR-Expression.

Die Analyse von p53 im Zellkern, EGFR im Zellkern und Zytoplasma sowie SGLT1 im Zellkern und Zytoplasma lieferte keine signifikante Korrelation zu den Endpunkten dieser Studie.

Obwohl endgültige Ergebnisse prospektiver Studien in beiden Fällen noch ausstehen, erscheint bislang eine prätherapeutische Evaluation des p53-Status und des EGFR-Status bei Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren durchaus sinnvoll, um

weitere prognostische Aussagen und ggf. eine Individualisierung der Therapie zu ermöglichen.

Sowohl p53 als auch EGFR sind als sog. molekulare Targets Mittelpunkt experimenteller und klinischer Studien der Phasen I bis III zur Erweiterung und Ergänzung aktueller therapeutischer Optionen (Cassell und Grandis 2010; Martins et al. 2013; Nemunaitis et al. 2009; Roh et al. 2011).

Beide Gewebemarkers gelten bereits jetzt als vielversprechende Angriffspunkte einer gewebespezifischen, selektiven Therapie der Kopf-Hals-Tumoren.

6 Literaturverzeichnis

- ADELSTEIN D, LEBLANC M (2006): Does induction chemotherapy have a role in the management of locoregionally advanced squamous cell head and neck cancer? *J Clin Oncol* 24(17), 2624-2628
- AEBERSOLD D, FROEHLICH S, JONCZY M, BEER K, LAISSUE J, GREINER R, DJONOV V (2002): Expression of transforming growth factor- α , epidermal growth factor receptor and platelet-derived growth factors A and B in oropharyngeal cancers treated by curative radiation therapy. *Radiother Oncol* 63, 275-283
- AKIMOTO T, HUNTER NR, BUCHMILLER L, MASON K, ANG KK, MILAS L (1999): Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* 5, 2884-2890
- ALSNER J, SORENSEN S, OVERGAARD J (2001): TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 59, 179-185
- ANG K, BERKEY B, TU X, ZHANG H-Z, KATZ R, HAMMOND E, FU K, MILAS L (2002): Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 62, 7350-7356
- ARGIRIS A, KARAMOUZIS MV, RABEN D, FERRIS RL (2008): Head and neck cancer. *Lancet* 371, 1695-1709
- AWWAD S, JAROS E, SOMES J, LUNEC J (1996): p53 overexpression in head and neck carcinoma and radiotherapy results. *Int J Radiat Oncology Biol Phys* 34(2), 323-332
- BAKER SJ, FEARON ER, NIGRO JM, HAMILTON SR, PREISINGER AC, JESSUP JM, VAN TUINEN P, LEDBETTER DH, BARKER DF, NAKAMURA Y, ET AL. (1989): Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217-221
- BARRON C, TSIANI E, TSAKIRIDIS T (2012): Expression of the glucose transporters GLUT1, GLUT3, GLUT4 and GLUT12 in human cancer cells. *BMC Proceedings* 6(Suppl 3), 4
- BENSAAD K, TSURUTA A, SELAK MA, VIDAL MNC, NAKANO K, BARTRONS R, GOTTLIEB E, VOUSDEN KH (2006): TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126(1), 107-120
- BENTZEN SM, ATASOY BM, DALEY FM, DISCHE S, RICHMAN PI, SAUNDERS MI, TROTT KR, WILSON GD (2005): Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 23(24), 5560-5567
- BHEDA A, CREEK KE, PIRISI L (2008): Loss of p53 induces epidermal growth factor receptor promoter activity in normal human keratinocytes. *Oncogene* 27(31), 4315-4323
- BISSONNETTE P, GAGNÉ H, COADY M, BENABDALLAH K, LAPOINTE J-Y, BERTELOOT A (1996): Kinetic separation and characterization of three sugar transport modes in Caco-2 cells. *Am J Physiol* 270, G833-843
- BLAIS A (1991): Expression of Na⁺-coupled sugar transport in HT-29 cells: modulation by glucose. *Am J Physiol* 260, C1245-1252
- BLESSING A, XU L, GAO G, BOLLY LR, REN J, LI H, WU X, SU F, HUANG W-C, HUNG M-C, ET AL. (2012): Sodium/Glucose Co-transporter 1 expression increases in human diseased prostate. *J Cancer Sci Ther* 04(09), 306-312

- BLOT WJ, MCLAUGHLIN JK, WINN DM, AUSTIN DF, GREENBERG RS, PRESTON-MARTIN S, BERNSTEIN L, SCHOENBERG JB, STEMHAGEN A, FRAUMENI JF (1988): Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48, 3282-3287
- BOENNINGHAUS H-G, LENARZ T: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 13. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2007
- BONNER JA, HARARI PM, GIRALT J, AZARNIA N, SHIN DM, COHEN RB, JONES CU, RANJAN SUR, RABEN D, JASSEM J, ET AL. (2006): Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354(6), 567-578
- BOSCH FX, RITTER D, ENDERS C, FLECHTENMACHER C, ABEL U, DIETZ A, HERGENHAHN M, WEIDAUER H (2004): Head and neck tumor sites differ in prevalence and spectrum of p53 alterations but these have limited prognostic value. *Int J Cancer* 111(4), 530-538
- BOTCHKAREV V, KOMAROVA EA, SIEBENHAAR F, BOTCHKAREVA NV, KOMAROV PG, MAURER M, GILCHREST BA, GUDKOV AV (2000): p53 Is essential for chemotherapy-induced hair loss. *Cancer Research* 60, 5002-5006
- BOURNE JA: Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden. 3. Auflage; DAKO Corporation, Carpintera 1997
- BOWERS G, REARDON D, HEWITT T, DENT P, MIKKELSEN R, VALERIE K, LAMMERING G, AMIR C, SCHMIDT-ULLRICH R (2001): The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene* 20, 1388-1397
- BOYLE JO, HAKIM J, KOCH W, VAN DER RIET P, HRUBAN RH, ARTURO ROA R, CORREO R, EBY YJ, RUBBERT JM, SIDRANSKY D (1993): The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 53: 4477-4480.
- BRIZEL DM, ALBERS ME, FISHER SR, SCHER RL, RICHTSMEIER WJ, HARS V, GEORGE SL, HUANG AT, PROSNITZ LR (1998): Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 338, 1798-1804
- BROSH R, ROTTER V (2009): When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 9(10), 701-713
- BUDACH W, HEHR T, BUDACH V, BELKA C, DIETZ K (2006): A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer* 6(28).
- BURSTONE MS (1958): Histochemical Comparison of Naphthol AS-Phosphates for the Demonstration of Phosphatases. *J Natl Cancer Inst* 20(3), 601-615
- CABELGUENNE A, BLONS H, DE WAZIERS I, CARNOT F, HOULLIER A, SOUSSI T, BRASNU D, BEAUNE P, LACCOURREYE O, LAURENT-PUIG P (2000): p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma- a prospective series. *J Clin Oncol* 18, 1465-1473
- CALIFANO J, VAN DER RIET P, WESTRA W, NAWROZ H, CLAYMAN G, PIANTADOSI S, CORIO R, LEE D, GREENBERG D, KOCH W, ET AL. (1996): Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56, 2488-2492
- CARPENTER G, COHEN S (1979): Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 48, 193-216

- CARPENTER G, COHEN S (1990): Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 265(14), 7709-7712
- CARPENTER G, LEMBACH KJ, MORRISON MM, COHEN S (1975): Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J Biol Chem* 250(11), 4297-4304
- CASNEUF VF, FONTEYNE P, VAN DAMME N, DEMETTER P, PAUWELS P, DE HEMPTINNE B, DE VOS M, VAN DE WIELE C, PEETERS M (2008): Expression of SGLT1, Bcl-2 and p53 in primary pancreatic cancer related to survival. *Cancer Invest* 26(8), 852-859
- CASSELL A, GRANDIS JR (2010): Investigational EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* 19(6), 709-722
- CHIN D, BOYLE GM, WILLIAMS RM, FERGUSON K, PANDEYA N, PEDLEY J, CAMPBELL CM, THEILE DR, PARSONS PG, COMAN WB (2005): Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer* 113(5), 789-797
- COOPER JS, PAJAK T, RUBIN P, TUPCHONG L, BRADY LW, LEIBEL SA, LARAMORE GE, MARCIAL VA, DAVIS LW, COX JD (1989): Second malignancies in patients who have head and neck cancer: incidence, effect on survival and implications based on the RTOG experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 17, 449-456
- CORDELL JL, FALINI B, ERBER WN, GHOSH AK, ABDULAZIZ Z, MACDONALD S, PULFORD KAF, STEIN H, MASON DY (1984): Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP-complexes). *J Histochem Cytochem* 32(2), 219-229
- CRANE RK (1960): Intestinal absorption of sugars. *Physiol Rev* 40, 789-825
- DASSONVILLE O, FORMENTO JL, FRANCOUAL M, RAMAIOLI A, SANTINI J, SCHNEIDER M, DEMARD F, MILANO G (1993): Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 11(10), 1873-1878
- DE VRIES A, FLORES ER, MIRANDA B, HSIEH HM, VAN OOSTROM CT, SAGE J, JACKS T (2002): Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5), 2948-2953
- DEB SP, MUÑOZ RM, BROWN DR, SUBLER MA, DEB S (1994): Wild-type human p53 activates the human epidermal growth factor receptor promoter. *Oncogene* 9, 1341-1349
- DERON P, VERMEERSCH H, MEES G, VANGESTEL C, PAUWELS P, VAN DE WIELE C (2011): Expression and prognostic value of glucose transporters and hexokinases in tonsil and mobile tongue squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol* 26, 1165-1172
- DITTMANN K, MAYER C, FEHRENBACHER B, SCHALLER M, RAJU U, MILAS L, CHEN DJ, KEHLBACH R, RODEMANN HP (2005): Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280(35), 31182-31189
- DITTMANN K, MAYER C, FEHRENBACHER B, SCHALLER M, KEHLBACH R, RODEMANN HP (2011): Nuclear epidermal growth factor receptor modulates cellular radio-sensitivity by regulation of chromatin access. *Radiother Oncol* 99(3), 317-322

- ERIKSEN JG, STEINICHE T, ASKAA J, ALSNER J, OVERGAARD J (2004): The prognostic value of epidermal growth factor receptor is related to tumor differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58(2), 561-566
- ESPADA J, HOROWBIN RW, STOCKERT JC (1997): Fluorescent cytochemistry of acid phosphatase and demonstration of fluid-phase endocytosis using an azo dye method. *Histochem Cell Biol* 108, 481-487
- FIELD JK, SPANDIDOS DA, MALLIRI A, GOSNEY JR, YIAGNISIS M, STELL PM (1991): Elevated p53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 64, 573-577
- FLIER JS, MUECKLER MM, USHER P, LODISH HF (1987): Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science* 235(4795), 1492-1495
- FREED-PASTOR WA, PRIVES C (2012): Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev* 26(12), 1268-1286
- FRIEDMANN M, W. LJ, MANDERS E, SCHAFFNER AD, KIRSHENBAUM GL, TANYERI HM, CALDARELLI DD, COON JS (2001): Prognostic significance of Bcl-2 and p53 Expression in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 23, 280-285
- GANAPATHY V, THANGARAJU M, PRASAD PD (2009): Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther* 121, 29-40
- GIORNO R (1984): A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol* 2, 161-166
- GOLDMAN SC, CHEN C-Y, LANSING TJ, GILMER TM, M.B. K (1996): The p53 signal transduction pathway is intact in human neuroblastoma despite cytoplasmic localization. *Am J Pathol* 148, 1381-1385
- GRANDIS JR, TWEARDY DJ (1993): Elevated levels of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 53, 3579-3584
- GRANDIS JR, MELHEM M, BARNES E, TWEARDY D (1996): Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth- α and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 78, 1284-1292
- GRANDIS JR, MELHEM M, GOODING W, DAY R, HOLST V, WAGENER M, DRENNING S, TWEARDY D (1998): Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 90(11), 824-832
- GREEN DR, KROEMER G (2009): Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458(7242), 1127-1130
- GREEN NM: Avidin. In: Anfinsen CB, Edsell JT and Richards FM (Hrsg.) *Advances in Protein Chemistry*. 29 Auflage; Academic Press, New York 1975, 85-133
- GREENBLATT MS, BENNETT WP, HOLLSTEIN M, HARRIS CC (1994): Mutations in the p53 Tumor suppressor gene-clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54, 4855-4878
- GRIFFIN TW, PAJAK TF, GILLESPIE BW, DAVIS LW, BRADY LW, RUBIN P, MARCIAL VA (1984): Predicting the response of head and neck cancers to radiation therapy with a multivariate modelling system: an analysis of the RTOG head and neck registry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10, 481-487

- GUO G, CAI Y, ZHANG B, XU R, QIU H, XIA L, JIANG W, HU P, CHEN X, ZHOU F, ET AL. (2011): Overexpression of SGLT1 and EGFR in colorectal cancer showing a correlation with the prognosis. *Med Oncol* 28(Suppl 1), 197-203
- HALL PA, LANE DP (1994): p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?-Revisited! *J Pathol* 172, 1-4
- HAN L, MA Q, LI J, LIU H, LI W, MA G, XU Q, ZHOU S, WU E (2011): High glucose promotes pancreatic cancer cell proliferation via the induction of EGF expression and transactivation of EGFR. *PLoS One* 6(11), e27074
- HANABATA Y, NAKAJIMA Y, MORITA K, KAYAMORI K, OMURA K (2011): Coexpression of SGLT1 and EGFR is associated with tumor differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Odontology* 100(2), 156-163
- HANADA N, LO HW, DAY CP, PAN Y, NAKAJIMA Y, HUNG MC (2006): Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog* 45(1), 10-17
- HASHIBE M, BRENNAN P, BENHAMOU S, CASTELLSAGUE X, CHEN C, CURADO MP, DAL MASO L, DAUDT AW, FABIANOVA E, FERNANDEZ L, ET AL. (2007): Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 99(10), 777-789
- HASHIBE M, BRENNAN P, CHUANG SC, BOCCIA S, CASTELLSAGUE X, CHEN C, CURADO MP, DAL MASO L, DAUDT AW, FABIANOVA E, ET AL. (2009): Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(2), 541-550
- HEDIGER MA, COADY MJ, IKEDA TS, WRIGHT EM (1987): Expression cloning and cDNA sequencing of Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330(26), 379-381
- HEDIGER MA, TURK E, WRIGHT EM (1989): Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and Escherichia coli Na⁺/proline cotransporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5748-5752
- HELMKE BM, REISSER C, IDZKOE M, DYCKHOFF G, HEROLD-MENDE C (2004): Expression of SGLT-1 in preneoplastic and neoplastic lesions of the head and neck. *Oral Oncol* 40(1), 28-35
- HERBST R (2004): Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59(2), 21-26
- HIRAYAMA BA, LOO DDF, DÍEZ-SAMPEDRO A, LEUNG DW, MEINILD A-K, LAI-BING M, TURK E, WRIGHT EM (2007): Sodium-dependent reorganization of the sugar-binding site of SGLT1. *Biochemistry* 46, 13391-13406
- HIRVIKOSKI P, KUMPULAINEN E, VIRTANIEMI J, JOHANSSON R, HAAPASALO H, MARIN S, HALONEN PM, HELIN H, RAITIOLA H, PUKANDER J, ET AL. (1997): p53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 15, 3111-3120
- HITT R, CIRUELOS E, AMADOR ML, BENITO A, SANCHEZ JJ, BALLESTIN C, CORTES-FUNES H (2005): Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer* 41(3), 453-460
- HOSHINO M, FUKUI H, ONO Y, SEKIKAWA A, ICHIKAWA K, TOMITA S, IMAI Y, IMURA J, HIRAISHI H, FUJIMORI T (2007): Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Pathobiology* 74(1), 15-21

- HOUK KN, LEACH AG, KIM SP, ZHANG X (2003): Bindungsaffinitäten von Wirt-Gast-, Protein-Ligand- und Protein-Übergangszustands-Komplexen. *Angew Chem* 115, 5020-5046
- HUBER SM, MISOVIC M, MAYER C, RODEMANN HP, DITTMANN K (2012): EGFR-mediated stimulation of sodium/glucose cotransport promotes survival of irradiated human A549 lung adenocarcinoma cells. *Radiother Oncol* 103(3), 373-379
- HUSMANN G, KAATSCH P, KATALINIC A, BERTZ J, HABERLAND J, KRAYWINKEL K, WOLF U: Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (Hrsg.). 7. Auflage; Berlin 2010
- ISHIKAWA N, OGURI T, ISOBE T, FUJITAKA K, KOHNO N (2001): SGLT gene expression in primary lung cancers and their metastatic lesions. *Jpn J Cancer Res* 92, 874-879
- JANSSON A, GENTILE M, SUN X-F (2001): p53 mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmatic p53 accumulation. *Int J Cancer* 92, 338-341
- JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D (2011): Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2), 69-90
- JIANG P, DU W, WANG X, MANCUSO A, GAO X, WU M, YANG X (2011): p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol* 13(3), 310-316
- KARSTENS JH, JANSSEN S, WERNER M, MEYER A, BRUNS F, MEIER K, BREMER M: Strahlentherapie und Radioonkologie aus interdisziplinärer Sicht. Lehmanns Media, Berlin 2010
- KEY M: Immunohistochemistry Staining Methods. In: Kumar GL, Rudbeck L (Hrsg.): Immunohistochemical Staining Methods. 5. Auflage; DAKO Cooperation, Carpintera 2009, 57-60
- KIPP H, KHOURSANDI S, SCHARLAU D, KINNE RK (2003): More than apical: distribution of SGLT1 in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(4), 737-749
- KÖHLER G, MILSTEIN C (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497
- KOMAROV PG, KOMAROVA EA, KONDRATOV RV, CHRISTOV-TSELKOV K, COON JS, CHERNOV MV, GUDKOV AV (1999): A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 285, 1733-1737
- KOMAROVA EA, KONDRATOV RV, WANG K, CHRISTOV K, GOLOVKINA TV, GOLDBLUM JR, GUDKOV AV (2004): Dual effect of p53 on radiation sensitivity in vivo: p53 promotes hematopoietic injury, but protects from gastro-intestinal syndrome in mice. *Oncogene* 23(19), 3265-3271
- KRESS M, MAY E, CASSINGENA R, MAY P (1979): Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 31, 472-483
- KUMAR A, PETRI ET, HALMOS B, BOGGON TJ (2008A): Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol* 26(10), 1742-1751
- KUMAR B, CORDELL KG, LEE JS, WORDEN FP, PRINCE ME, TRAN HH, WOLF GT, URBA SG, CHEPEHA DB, TEKNOS TN, ET AL. (2008B): EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 26(19), 3128-3137

- LANE DP, CRAWFORD LV (1979): T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263
- LEONG AS-Y: Immunohistochemistry-theoretical and practical aspects. In: Leong AS-Y (Hrsg.) *Applied Immunohistochemistry for the Surgical Pathologist*. Edward Arnold Publishers, London 1993, 1-22
- LEONG TY-M, LEONG AS-Y (2007): How does antigen retrieval work. *Adv Anat Pathol* 14, 129-131
- LEVINE A (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell Signal* 88, 323-331
- LICCARDI G, HARTLEY JA, HOCHHAUSER D (2011): EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res* 71(3), 1103-1114
- LIN S-Y, MAKINO K, XIA W, MATIN A, WEN Y, KWONG KY, BOURGUIGNON L, HUNG M-C (2001): Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3, 802-808
- LINZER DI, LEVINE AJ (1979): Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52
- LO HW, HSU SC, ALI-SEYED M, GUNDUZ M, XIA W, WEI Y, BARTHOLOMEUSZ G, SHIH JY, HUNG MC (2005): Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 7(6), 575-589
- LO HW, CAO X, ZHU H, ALI-OSMAN F (2010): Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Mol Cancer Res* 8(2), 232-245
- LUDES-MEYER JH, SUBLER MA, SHIVAKUMAR CV, MUÑOZ RM, JIANG P, BIGGER JE, BROWN DR, DEB SP, DEB S (1996): Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Mol Cell Biol* 16(11), 6009-6019
- MAGNÉ N, PIVOT X, BENSADOUN R-J, GUARDIOLA E, POISSONNET G, DASSONVILLE O, FRANCOUAL M, FORMENTO J-L, DEMARD F, SCHNEIDER M, ET AL. (2001): The relationship of epidermal growth factor receptor levels to the prognosis of unresectable pharyngeal cancer patients treated by chemo-radiotherapy. *Eur J Cancer* 37, 2169-2177
- MARTINS RG, PARVATHANENI U, BAUMAN JE, SHARMA AK, RAEZ LE, PAPAGIKOS MA, YUNUS F, KURLAND BF, EATON KD, LIAO JJ, ET AL. (2013): Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 31(11), 1415-1421
- MATOKA S, KANG JG, PATINO WD, WRAGG A, BOEHM M, GAVRILOVA O, HURLEY PJ, BUNZ F, HWANG PM (2006): p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312(5780): 1650-1653.
- MATTOUT A, GOLDBERG M, TZUR Y, MARGALIT A, GRUENBAUM Y (2007): Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes. *J Cell Sci* 120(Pt 1), 77-85
- MAURIZI M, ALMADORI G, FERRANDINA G, DISTEFANO M, ROMANINI ME, CADONI G, BENEDETTI-PANICI P, PALUDETTI G, SCAMBIA G, MANCUSO S (1996): Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 74, 1253-1257

- MERLANO M, OCCELLI M (2007): Review of cetuximab in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ther Clin Risk Manag* 3(5), 871-876
- MINETA H, BORG A, DICTOR M, WAHLBERG P, AKERVALL J, WENNERBERG J (1998): p53 mutation, but not p53 overexpression, correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 78(8), 1084-1090
- NEES M, HOMANN N, DISCHER H, ANDL T, ENDERS C, HEROLD-MENDE C, SCHUHMANN A, BOSCH FX (1993): Expression of mutated p53 occurs in tumor-distant epithelia of head and neck cancer patients-a possible molecular basis for the development of multiple tumors. 1993 53, 4189-4196
- NEMUNAITIS J, CLAYMAN G, AGARWALA SS, HRUSHESKY W, WELLS JR, MOORE C, HAMM J, YOO G, BASELGA J, MURPHY BA, ET AL. (2009): Biomarkers predict p53 gene therapy efficacy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 15(24), 7719-7725
- NICHOLSON RI, GEE JMW, HARPER ME (2001): EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37, 9-15
- OREN M, ROTTER V (2010): Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2): 2-15.
- OVERGAARD J, HANSEN HS, JORGENSEN K, HANSEN MH (1986): Primary radiotherapy of larynx and pharynx carcinoma-an analysis of some factors influencing local control and survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12, 515-521
- PANAYOTOVA-HEIERMANN M, LOO DDF, KONG C-T, LEVER JE, WRIGHT EM (1996): Sugar binding to Na⁺/Glucose cotransporters is determined by the carboxyl-terminal half of the protein. *J Biol Chem* 271(17), 10029-10034
- PANAYOTOVA-HEIERMANN M, ESKANDARI S, TURK E, ZAMPIGHI GA, WRIGHT EM (1997): Five transmembrane helices form the sugar pathway through the Na⁺/Glucose Cotransporter. *J Biol Chem* 272(33), 20324-20327
- PARKIN D, BRAY F, FERLAY J, PISANI P (2005): Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108
- PETITJEAN A, MATHE E, KATO S, ISHIOKA C, TAVTIGIAN SV, HAINAUT P, OLIVIER M (2007): Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 28(6), 622-629
- PFISTER DG, ANG KK, BRIZEL DM, BURTNES BA, CMELAK AJ, COLEVAS AD, DUNPHY F, EISELE DW, GILBERT J, GILLISON ML ET AL. (2011): Head and Neck Cancers. *J Natl Compr Canc Netw* 9, 596-650
- PIGNON J-P, LE MAÎTRE A, MAILLARD E, BOURHIS J (2009): Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH_NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and Oncology* 92, 4-14
- POETA ML, MANOLA J, GOLDWASSER MA, FORASTIERE A, BENOIT N, CALIFANO JA, RIDGE JA, GOODWIN J, KENADY D, SAUNDERS J, ET AL. (2007): TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck *N Engl J Med* 357(25), 2552-2561
- PREIB J, DORNOFF W, HAGMANN F-G, SCHMIEDER A: *Onkologie 2012/13. Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie*. W. Zuckschwerdt Verlag, Germering/München 2012
- PUKKILA MJ, KUMPULAINEN EJ, VIRTANIEMI JA, JOHANSSON RT, HALONEN PM, KELLOKOSKI JK, KOSUNEN AST, NUUTINEN J, KOSMA V-M (2002): Nuclear and cytoplasmic p53 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic implications. *Head Neck* 24, 784-791

- RAYBAUD-DIOGÈNE H, FORTIN A, MORENCY R, ROY J, MONTEIL RA, TETU B (1997): Markers of radioresistance in squamous cell carcinomas of the head and neck: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Clin Oncol* 15(3), 1030-1038
- REN J, BOLLU LR, SU F, GAO G, XU L, HUANG WC, HUNG MC, WEIHUA Z (2013): EGFR-SGLT1 interaction does not respond to EGFR modulators, but inhibition of SGLT1 sensitizes prostate cancer cells to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Prostate* 73(13), 1453-1461
- ROH JL, KANG SK, MINN I, CALIFANO JA, SIDRANSKY D, KOCH WM (2011): p53-Reactivating small molecules induce apoptosis and enhance chemotherapeutic cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 47(1), 8-15
- RÖMER L, KLEIN C, DEHNER A, KESSLER H, BUCHNER J (2006): p53-ein natürlicher Krebskiller: Einsichten in die Struktur und Therapiekonzepte. *Angew Chem* 118, 6590-6611
- ROTTER V (1983): p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 2613-2617
- RUBIN P, CONSTINE LS, FAJARDO LF, PHILLIPS TL, WASSERMAN TH (1995): Overview of late effects normal tissues (LENT) scoring system. *Radiother Oncol* 35, 9-10
- SALOMON DS, BRANDT R, CIARDIELLO F, NORMANNO N (1995): Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19, 183-232
- SANDERSON R, IRONSIDE J (2002): Squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br Med J* 325: 822-827.
- SANTINI J, FORMENTO JL, FRANCOUAL M, MILANO G, SCHNEIDER M, DASSONVILLE O, DEMARD F (1991): Characterization, quantification and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 13, 132-139
- SAUTER ER, RIDGE JA, LITWIN S, LANGER CJ (1995): Pretreatment p53 protein expression correlates with decreased survival in patients with end-stage head and neck cancer. 1993 *Clin Cancer Res*, 1407-1412
- SCHÄFER U, MICKE O, MÜLLER SB, SCHÜLLER P, WILICH N (2003): Hemoglobin as an independent prognostic factor in the radiotherapy of head and neck tumors. *Strahlenther Onkol* 179(8), 527-534
- SCHMIDT-ULLRICH R, VALERIE K, CHAN W, MCWILLIAMS D (1994): Altered Expression of epidermal growth factor receptor and estrogen receptor in MCF-7 cells after single and repeated radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29, 813-819
- SCHWARTZENBERG-BAR-YOSEPH F, ARMONI M, KARNIELI E (2004): The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 64(7), 2627-2633
- SEEGENSCHMIEDT MH, MÜLLER R-P, HÖFFKEN K, JUNGINGER K, SAUER H (1999): Dokumentation von Nebenwirkungen in der Onkologie. *Dtsch Ärzteblatt* 96(8), 489-495
- SEEGENSCHMIEDT MH, MÜLLER R-P, HÖFFKEN K, JUNGINGER K, SAUER H (2000): LENT-SOMA-Kriterien, Interdisziplinäre Bewertung von langfristigen Therapieerfolgen in der Onkologie. *Dtsch Ärzteblatt* 97(37), 2396-2401

- SHEIKH MS, CARRIER F, JOHNSON AC, OGDON SE, FORNACE JR. AJ (1997): Identification of an additional p53-responsive site in the human epidermal growth factor receptor gene promoter. *Oncogene* 15, 1095-1101
- SHERIDAN MT, O'DWYER T, SEYMOUR CB, MOTHERSILL CE (1997): Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol Investig* 5, 180-186
- SHI RR, KEY ME, KALRA KL (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39, 741-748
- SHIN D, RO J, HONG W, HITTELMANN W (1994): Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 54, 3153-3159
- SIEBERT G (1961): Enzyme und Substrate der Glykolyse in isolierten Zellkernen. *Biochem Z* 334, 369
- SLAUGHTER DP, SOUTHWICK HW, SMEJKAL W (1953): "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer* 6, 963-968
- SPECTOR J, SESSIONS D, HAUGHEY BH (2001): Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope* 111, 1079-87
- STIERLÉ V, COUPRIE J, ÖSTLUND C, KRIMM I, ZINN-JUSTIN S, HOSSENLOPP P, WORMAN HJ, COURVALIN JE-C, DUBAND-GOULET I (2003): The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry* 42, 4819-4828
- SUNTHARALINGAM M, HAAS ML, VAN ECHO DA, HADDAD R, JACOBS MC, LEVY S, GRAY WC, ORD RA, B.A. C (2001): Predictors of responses and survival after concurrent chemotherapy and radiation for locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer* 91(3), 548-554
- TAKATA K (1996): Glucose transporters in the transepithelial transport of glucose. *J Electron Microsc* 45, 275-284
- TAYLOR CR, SHI SR, CHAIWUN B, YOUNG L, IMAM A, COTE RJ (1994): Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections. *Hum Pathol* 25, 163-270
- TEJWANI A, WU S, JIA Y, AGULNIK M, MILLENDER L, LACOUTURE ME (2009): Increased risk of high-grade dermatologic toxicities with radiation plus epidermal growth factor receptor inhibitor therapy. *Cancer* 115(6), 1286-1299
- TEMAM S, FLAHAULT A, PÉRIÉ S, MONCEAUX G, COULET F, CALLARD P, BERNAUDIN J, LACAU ST GUILY J, FOURET P (2000): p53 gene Sstatus as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol* 18, 385-394
- THORENS B, MUECKLER M (2009): Glucose transporters in the 21st century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, 141-145
- TROTTI A, COLEVAS A, SETSER A, RUSCH V, JAQUES D, BUDACH V, LANGER C, MURPHY B, CUMBERLIN R, COLEMAN C (2003): CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol* 13(3), 176-181
- TURK E, MARTÍN MG, WRIGHT EM (1994): Structure of the human Na⁺/Glucose cotransporter gene SGLT1. *J Biol Chem* 21, 15204-15209

- VIELBA R, BILBAO J, ISPIZUA A, ENG C, ZABALEZA I, ALFARO J, REZOLA R, MORENO E, ELORRIAGA J, ALONSO I, ET AL. (2003): p53 and Cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 113, 167-172
- VOUSDEN KH, LU X (2002): Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2(8), 594-604
- WARBURG O (1956): On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191): 309-314.
- WARNKE R (1979): Alteration on immunoglobulin-bearing lymphoma cells by fixation. *Histochem Cytochem* 27, 1195-1196
- WEIHUA Z, TSAN R, HUANG WC, WU Q, CHIU CH, FIDLER IJ, HUNG MC (2008): Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer Cell* 13(5), 385-393
- WEINBERG RA: *The biology of cancer*. 2. Auflage; Garland Science, Taylor & Francis Group, New York 2014
- WENDT TG, GRABENBAUER GC, RÖDEL CM, THIEL H-J, AYDIN H, ROHLOFF R, WUSTROW TPU, IRO H, POPELLA C, SCHALHORN A (1998): Simultaneous radiochemotherapy versus radiotherapy alone in advanced head and neck cancer- a randomized multicenter study. *J Clin Oncol* 16, 1318-1324
- WESTPHAL CH, ROWAN S, SCHMALTZ C, ELSON A, FISHER DE, LEDER P (1997): Atm and p53 cooperate in apoptosis and suppression of tumorigenesis, but not in resistance to acute radiation toxicity. *Nat Genet* 16, 397-401
- WILCHEK M, BAYER EA (1988): The Avidin-Biotin complex in bioanalytical applications. *Anal Biochem* 171, 1-32
- WITTEKIND C, MEYER H-J: *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 7. Auflage; Wiley-Vch Verlag, Weinheim 2010
- WOLFF HA, BOSCH J, JUNG K, OVERBECK T, HENNIES S, MATTHIAS C, HESS CF, ROEDEL RM, CHRISTIANSEN H (2010): High-grade acute organ toxicity as positive prognostic factor in primary radio(chemo)therapy for locally advanced, inoperable head and neck cancer. *Strahlenther Onkol* 186(5), 262-268
- WRIGHT EM, TURK E (2004): The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch* 447(5), 510-518
- WRIGHT EM, HIRAYAMA BA, LOO DF (2007): Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med* 261(1), 32-43
- WRIGHT EM, LOO DDF, HIRAYAMA B (2011): Biology of Human Sodium Glucose Transporters. *Physiol Rev* 91, 733-794
- YAMAMOTO T, SEINO Y, FUKUMOTO H, KOH G, YANO H, INAGAKI N, YAMADA Y, INOUE K, MANABE T, IMURA H (1990): Overexpression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 170(1), 223-230
- YARDEN Y, SLIWKOWSKI M (2001): Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-137
- YUAN J, SIMONS G, BLOBELT G, GEORGATOS SD (1991): Binding of LaminA to polynucleosomes. *J Biol Chem* 266(14): 9211-9215.
- ZHAO F-Q, KEATING AF (2007): Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics* 8, 113-128

7 Anhang

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Antikörper	29
Tabelle 2: Puffer und Lösungen.....	30
Tabelle 3: Laborkits	31
Tabelle 4: Geräte.....	31
Tabelle 5: Zubehör	32
Tabelle 6: Software	32
Tabelle 7: Übersicht über das Auftreten von akuter und chronischer Toxizität	54
Tabelle 8: T-Stadien von Mundhöhle und Lippe	99
Tabelle 9: T-Stadien des Oropharynx	99
Tabelle 10: T-Stadien des Hypopharynx	100
Tabelle 11: T-Stadien der Supraglottis	100
Tabelle 12: T-Stadien der Glottis.....	101
Tabelle 13: T-Stadien der Subglottis	101
Tabelle 14: N-Stadien für Kopf-Hals-Tumoren.....	102
Tabelle 15: M-Stadien für Kopf-Hals-Tumoren	102
Tabelle 16: UICC-Stadien	102
Tabelle 17: Histologisches Grading von Tumoren	103
Tabelle 18: Schweregrad der Hämatotoxizität nach CTCAE.....	103
Tabelle 19: Schweregrad der Mukositis nach CTCAE.....	103
Tabelle 20: Schweregrad der Hautreaktion/Epitheliolyse nach CTCAE.....	104
Tabelle 21: Schweregrad der Dysphagie nach CTCAE.....	104

7	Anhang	98
	Tabelle 22: Schweregrad der Übelkeit nach CTCAE.....	104
	Tabelle 23: Schweregrad der Xerostomie nach CTCAE.....	105
	Tabelle 24: Übersicht über die SLC5-Genfamilie.....	105
	Tabelle 25: Übersicht über SLC2-Genfamilie.....	106
	Tabelle 26: Patientendaten vor Therapiebeginn.....	106
	Tabelle 27: Vergleich von Avidin vs. Streptavidin.....	108
	Tabelle 28: Übersicht über Remission und Überleben.....	108
	Tabelle 29: Übersicht über lokoregionäre Kontrolle und Metastasen.....	109

Tabellen***Tabelle 8: T-Stadien von Mundhöhle und Lippe (Wittekind und Meyer 2010)***

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor mit maximal 2 cm Ausdehnung
T2	Tumor mit mindestens 2 cm, maximal 4 cm Ausdehnung
T3	Tumor mit mehr als 4 cm Ausdehnung
T4a	Tumor mit Ausdehnung auf Nachbarstrukturen (Tiefeninfiltration)
T4b	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Proc. pterygoideus oder Schädelbasis oder umschliesst die Arteria carotis

Tabelle 9: T-Stadien des Oropharynx (Wittekind und Meyer 2010)

T1	Tumor mit maximal 2 cm Ausdehnung
T2	Tumor mit mindestens 2 cm, maximal 4 cm Ausdehnung
T3	Tumor mit mehr als 4 cm Ausdehnung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Zungenmuskulatur, lamina mediastinalis des Proc. pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Proc. pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die Arteria carotis

Tabelle 10: T-Stadien des Hypopharynx (Wittekind und Meyer 2010)

T1	Tumor beschränkt sich auf einen Unterbezirk (Sinus piriformis, Postkrikoidregion, Hypopharynxhinterwand)
T2	Tumor ausgedehnt auf mehrere Bezirke oder Nachbarbezirk ohne Fixation an die Umgebung
T3	Tumor ausgedehnt auf mehrere Bezirke oder Nachbarbezirk mit Fixation an die Umgebung (Larynx, oberer Ösophagus, Oropharynx)
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Halsweichteile
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszien, umschließt Arteria carotis oder infiltriert mediastinale Strukturen

Tabelle 11: T-Stadien der Supraglottis (Wittekind und Meyer 2010)

T1	Tumor beschränkt auf Unterbezirk der Supraglottis, mit normaler Stimmlippenbewegung
T2	Tumor infiltriert die Schleimhaut von mehr als einem benachbarten Unterbezirk der Supraglottis oder Glottis oder eines Anteils außerhalb der Supraglottis (z.B. Schleimhaut von Zungenrund, Vallecula, medialer Wand des Sinus piriformis), ohne Fixation des Larynx
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation, und/oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirks oder des präepiglottischen Gewebes
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses, eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A.carotis interna

Tabelle 12: T-Stadien der Glottis (Wittekind und Meyer 2010)

T1	Tumor auf Stimmlippe(n) begrenzt, mit normaler Beweglichkeit
T1a	Tumor auf eine Stimmlippe begrenzt
T1b	Tumorbefall beider Stimmlippen
T2	Tumor breitet sich auf Supraglottis und/oder Subglottis aus und/oder Tumor mit eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation und/oder Invasion des Postkrikoidbezirks und/oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a und T4b	stimmen mit der Einteilung des supraglottischen Karzinoms überein

Tabelle 13: T-Stadien der Subglottis (Wittekind und Meyer 2010)

T1	Tumor auf Subglottis beschränkt
T2	Tumor breitet sich auf eine Stimmlippe oder beide Stimmlippen aus, diese mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit
T3	Tumor auf Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation
T4a und 4b	stimmen mit der Einteilung des supraglottischen Karzinoms überein

Tabelle 14: N-Stadien für Kopf-Hals-Tumoren (Wittekind und Meyer 2010)

N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Ipsilaterale, solitäre Lymphknotenmetastase ≤ 3 cm
N2a	Ipsilaterale, solitäre Lymphknotenmetastase, >3 cm bis 6 cm
N2b	Ipsilaterale, multiple Lymphknotenmetastasen, >3 cm bis 6 cm
N2c	Bilaterale oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen, >3 cm bis 6 cm
N3	Lymphknotenmetastasen >6 cm

Tabelle 15: M-Stadien für Kopf-Hals-Tumoren (Wittekind und Meyer 2010)

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 16: UICC-Stadien (Preiß et al. 2012)

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	Jedes T	N1	M0
Stadium IVa	T4	N0/1	M0
	Jedes T	N2	M0
Stadium IVb	Jedes T	N3	M0
Stadium IVc	Jedes T	N3	M1

Tabelle 17: Histologisches Grading von Tumoren (Wittekind und Meyer 2010)

Gx	Nicht bestimmbar
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert

Tabelle 18: Schweregrad der Hämatotoxizität nach CTCAE

	gering/leicht	mäßig/deutlich	stark/ausgeprägt	lebensbedrohlich
	=	=	=	=
	1	2	3	4
Hämoglobin (g/100ml)	10,0-10,9	8,0-9,9	6,5-8,9	<6,5
Leukozyten (10 ⁹ /l)	3,0-3,9	2,0-2,9	1,0-1,9	<1,0
Thrombozyten (10 ⁹ /l)	75,0-99,9	50,0-74,9	25,0-49,9	<25,0

Tabelle 19: Schweregrad der Mukositis nach CTCAE

Grad 1	Geringes Erythem, Beläge oder geringe Schmerzen
Grad 2	Schmerzhafte, fleckige Mukositis, blutige Beläge, milde Analgetika
Grad 3	Konfluierende fibrinöse Mukositis, starke Schmerzen, starke Analgetika
Grad 4	Tiefe Ulzera, Hämorrhagie; PEG/parenterale Ernährung

Tabelle 20: Schweregrad der Hautreaktion/Epitheliolyse nach CTCAE

Grad 1	Geringes Erythem, Epilation, trockene Desquamation, reduzierte Schweißsekretion
Grad 2	Mäßiges Erythem, vereinzelt feuchte Epitheliolyse (<50 %), starkes Ödem, lokale Therapie
Grad 3	Ausgeprägtes Ödem, konfluierende feuchte Epitheliolyse (>50 %), starkes Ödem, intensive Therapie
Grad 4	Tiefe Ulzera, Hämorrhagie oder Nekrose, operative Therapie

Tabelle 21: Schweregrad der Dysphagie nach CTCAE

Grad 1	Geringes Wundsein, Erythem, schmerzlose Erosionen
Grad 2	Schmerzhafte Erytheme, Ödem oder Erosionen; mäßige Dysphagie
Grad 3	Starke Dysphagie; Ulzera; flüssige Nahrung oder Analgetika notwendig
Grad 4	Verschluss oder Perforation; PEG/parenterale Ernährung

Tabelle 22: Schweregrad der Übelkeit nach CTCAE

Grad 1	Gering, normale Nahrungsaufnahme
Grad 2	Mäßig, Nahrungsaufnahme vermindert
Grad 3	Stark, keine Nahrungsaufnahme möglich

Tabelle 23: Schweregrad der Xerostomie nach CTCAE

Grad 1	Geringe Mundtrockenheit, zäher Speichel, Geschmacksstörung; normale Kost
Grad 2	Mäßige Mundtrockenheit, sehr zäher Speichel, mäßige Geschmacksstörung; feste/breiige Nahrung
Grad 3	Komplette Mundtrockenheit, kompletter Geschmacksverlust, flüssige Nahrung
Grad 4	Akute Nekrose, tiefe Ulzera, PEG/parenterale Ernährung

Tabelle 24: Übersicht über die SLC5-Genfamilie (Wright et al. 2011)

Gen	Substrat	K _m (mM)	Lokalisation
SGLT1 (SLC5A1) Co-Transporter	Glukose, Galaktose	je 0,5	Dünndarm, Trachea, Niere, Herz, Gehirn, Hoden, Prostata
SGLT2 (SLC5A2) Co-Transporter	Glukose	6	Niere, Gehirn, Leber Schilddrüse, Muskel, Herz
SGLT3 (SLC5A4) Glukosensor	Glukose	20	Dünndarm, Hoden, Uterus, Lunge, Gehirn, Schilddrüse
SGLT4 (SLC5A9) Co-Transporter	Glukose, Mannose	2 und 0,15	Dünndarm, Niere, Leber, Gehirn, Lunge, Tracheo, Uterus, Pankreas
SGLT5 (SLC5A10) Co-Transporter	Glukose, Galaktose	Keine Angaben	Nierenrinde

Tabelle 25: Übersicht über SLC2-Genfamilie (Thorens und Mueckler 2009; Zhao und Keating 2007)

Gen	Substrat	K _m (mM)	Lokalisation
GLUT 1	Glukose	3-7	Erythrozyten, Kapillarendothelien
GLUT 2	Glukose, Fruktose	17	Niere, Dünndarm, Leber, Pankreas
GLUT 3	Glukose	1,5	Gehirn, Leukozyten
GLUT 4	Glukose	6,6	Fettgewebe, Muskel
GLUT 5	Fruktose, Glukose	> 10 mM	Dünndarm, Niere

Tabelle 26: Patientendaten vor Therapiebeginn

Charakteristika	Anzahl Patienten n=233 (%)
Geschlecht	
männlich	197 (85 %)
weiblich	36 (15 %)
Tumorlokalisation	
Mundhöhle	63 (27 %)
Oropharynx	99 (42,5 %)
Hypopharynx	45 (19,3 %)
Larynx	26 (11,2 %)
UICC-Stadium	
II	7 (3 %)
III	16 (6,9 %)
IV A/B	189/21 (90,1 %)
T-Stadium	
1	7 (3 %)
2	17 (7,3 %)
3	39 (16,7 %)
4	170 (73 %)
N-Stadium	
0	35 (15 %)
1	27 (11,6 %)

2	149 (64 %)
3	22 (9,4 %)
Histologisches Grading	
1	11 (4,7 %)
2	187 (80,3 %)
3	35 (15 %)
Risikofaktoren	
Nikotin	
Ja	199 (85,4 %)
Nein	17 (7,3 %)
Keine Angaben	17 (7,3 %)
Alkohol	
Ja	173 (74,2 %)
Gelegentlich	28 (12 %)
Regelmäßig	114 (48,9 %)
Abstinent	31 (13,3 %)
Nein	43 (18,5 %)
Keine Angaben	17 (7,3 %)
Kombinierter Nikotin- und Alkoholabusus	166 (71,2 %)

Tabelle 27: Vergleich von Avidin vs. Streptavidin (Green 1975)

	Avidin	Streptavidin
Chemische Natur	Glykoprotein/Homotetramer	Protein/Homotetramer
Molekülgröße	66-69 kDa	60 kDa
Vorkommen	Hühnereiweiß	Streptomyces avidinii
Ladung	positiv	keine
Isoelektrischer Punkt (pI) nativ modifiziert	~ 10* ~ 7 (deglykosiliert)	~ 5 ~ 7 (rekombinant)
Affinitätskonstante zu Biotin	$\approx 10^{15*}$	$\approx 10^{14}$
Anzahl der Biotin-Bindungstaschen	4	4
Bemerkungen	Die Bindungsaffinität des Avidin gegenüber konjugiertem Biotin ist kleiner als von Streptavidin	

Tabelle 28: Übersicht über Remission und Überleben

<u>Remission</u>	Komplettremission	126
	Teilremission	48
	Stable disease	19
	Tumorprogress	20
	keine Angaben	20
<u>Überleben</u>	Am Leben	48
	Verstorben	185
	Tumorbedingt	127

Tabelle 29: Übersicht über lokoregionäre Kontrolle und Metastasen

<u>Rezidiv</u>	Lokal	44
	Regionär	8
	Lokoregionär	14
<u>Metastasen</u>	Fernmetastasen	28
	Zweittumor	17

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die Funktion von p53 im Rahmen der Zellzykluskontrolle	10
Abbildung 2: Struktureller Aufbau des EGFR als Homomer und in dimerisierter Form	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der EGFR-vermittelten Signalwege	15
Abbildung 4: Zelluläre Lokalisation der Glukosetransporter	19
Abbildung 5: Prinzip der Antigenmarkierung bei immunhistochemischen Methoden	37
Abbildung 6: Prinzip der ABC-und LSAB-Methode	38
Abbildung 7: Hydrolysereaktion	40
Abbildung 8: Chromogenreaktion	41
Abbildung 9: p53-Färbung bei Mundhöhlen-Karzinom	47
Abbildung 10: p53-Färbung bei Larynx-Karzinom	47
Abbildung 11: EGFR-Färbung bei Larynx-Karzinom	48
Abbildung 12: EGFR-Färbung bei Zungengrund-Karzinom	48
Abbildung 13: SGLT1-Färbung bei Mundboden-Karzinom	48
Abbildung 14: SGLT1-Färbung bei Hypopharynx-Karzinom	48
Abbildung 15: Streudiagramm der p53-Expression im Zellkern und der EGFR-Expression in der Zellmembran	49
Abbildung 16: Streudiagramm der p53-Expression im Zellkern und der SGLT1-Expression im Zellkern	50
Abbildung 17: Streudiagramm der p53-Expression im Zellkern und der SGLT1-Expression im Zytoplasma	50
Abbildung 18: Streudiagramm der SGLT1-Expression im Zytoplasma und der p53-Expression im Zytoplasma	51
Abbildung 19: Streudiagramm der EGFR-Expression in der Zellmembran und der SGLT1-Expression im Zellkern	51
Abbildung 20: Streudiagramm der SGLT1-Expression im Zytoplasma und der SGLT1-Expression im Zellkern	52
Abbildung 21: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3	57

Abbildung 22: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3.....	57
Abbildung 23: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2	58
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Schätzer metastasenfrees Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zytoplasma	62
Abbildung 25: Kaplan-Meier-Schätzer rezidivfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zytoplasma	64
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Schätzer rezidivfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression in der Zellmembran.....	65
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Schätzer Gesamtüberleben bei niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zytoplasma	66
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Schätzer Gesamtüberleben niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression in der Zellmembran	67
Abbildung 29: Kaplan-Meier-Schätzer krankheitsfreies Überleben des Gesamtkollektivs.....	116
Abbildung 30: Kaplan-Meier-Schätzer Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs	116
Abbildung 31: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität.....	117
Abbildung 32: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität.....	117
Abbildung 33: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität.....	118
Abbildung 34: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität.....	118
Abbildung 35: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität	119
Abbildung 36: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität.....	119
Abbildung 37: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität.....	120
Abbildung 38: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3	120

Abbildung 39: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3	121
Abbildung 40: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3	121
Abbildung 41: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3	122
Abbildung 42: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3	122
Abbildung 43: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3	123
Abbildung 44: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3	123
Abbildung 45: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3	124
Abbildung 46: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3	124
Abbildung 47: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3	125
Abbildung 48: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3	125
Abbildung 49: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3	126
Abbildung 50: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3	126
Abbildung 51: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3	127
Abbildung 52: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3	127
Abbildung 53: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3	128
Abbildung 54: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3	128
Abbildung 55: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3	129

Abbildung 56: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3.....	129
Abbildung 57: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2	130
Abbildung 58: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2	130
Abbildung 59: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2	131
Abbildung 60: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2.....	131
Abbildung 61: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2	132
Abbildung 62: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2	132
Abbildung 63: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Organtoxizität	133
Abbildung 64: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Organtoxizität	133
Abbildung 65: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Organtoxizität	134
Abbildung 66: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Organtoxizität	134
Abbildung 67: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf höhergradige Organtoxizität.....	135
Abbildung 68: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Organtoxizität	135
Abbildung 69: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Organtoxizität	136
Abbildung 70: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Gesamtttoxizität	136
Abbildung 71: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Gesamtttoxizität	137
Abbildung 72: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Gesamtttoxizität	137

Abbildung 73: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Gesamtoxizität	138
Abbildung 74: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf höhergradige Gesamtoxizität.....	138
Abbildung 75: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Gesamtoxizität	139
Abbildung 76: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Gesamtoxizität	139
Abbildung 77: Kaplan-Meier-Schätzer rezidivfreies Überleben des Gesamtkollektivs.....	140
Abbildung 78: Kaplan-Meier-Schätzer metastasenfreies Überleben des Gesamtkollektivs.....	140
Abbildung 79: Kaplan-Meier-Schätzer krankheitsfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zellkern.....	141
Abbildung 80: Kaplan-Meier-Schätzer krankheitsfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zytoplasma	141
Abbildung 81: Kaplan-Meier-Schätzer krankheitsfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zellkern.....	142
Abbildung 82: Kaplan-Meier-Schätzer krankheitsfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zytoplasma	142
Abbildung 83: Kaplan-Meier-Schätzer krankheitsfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression in der Zellmembran.....	143
Abbildung 84: Kaplan-Meier-Schätzer krankheitsfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zellkern.....	143
Abbildung 85: Kaplan-Meier-Schätzer krankheitsfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zytoplasma	144
Abbildung 86: Kaplan-Meier-Schätzer metastasenfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zellkern.....	144
Abbildung 87: Kaplan-Meier-Schätzer metastasenfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zellkern.....	145
Abbildung 88: Kaplan-Meier-Schätzer metastasenfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zytoplasma	145
Abbildung 89: Kaplan-Meier-Schätzer metastasenfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression in der Zellmembran.....	146

Abbildung 90: Kaplan-Meier-Schätzer metastasenfrees Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zellkern.....	146
Abbildung 91: Kaplan-Meier-Schätzer metastasenfrees Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zytoplasma	147
Abbildung 92: Kaplan-Meier-Schätzer rezidivfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zellkern.....	147
Abbildung 93: Kaplan-Meier-Schätzer rezidivfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zellkern.....	148
Abbildung 94: Kaplan-Meier-Schätzer rezidivfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zytoplasma	148
Abbildung 95: Kaplan-Meier-Schätzer rezidivfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zellkern.....	149
Abbildung 96: Kaplan-Meier-Schätzer rezidivfreies Überleben bei niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zytoplasma	149
Abbildung 97: Kaplan-Meier-Schätzer Gesamtüberleben bei niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zellkern.....	150
Abbildung 98: Kaplan-Meier-Schätzer Gesamtüberleben bei niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zellkern	150
Abbildung 99: Kaplan-Meier-Schätzer Gesamtüberleben bei niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zytoplasma	151
Abbildung 100: Kaplan-Meier-Schätzer Gesamtüberleben bei niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zellkern.....	151
Abbildung 101: Kaplan-Meier-Schätzer Gesamtüberleben bei niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zytoplasma	152

Abbildungen

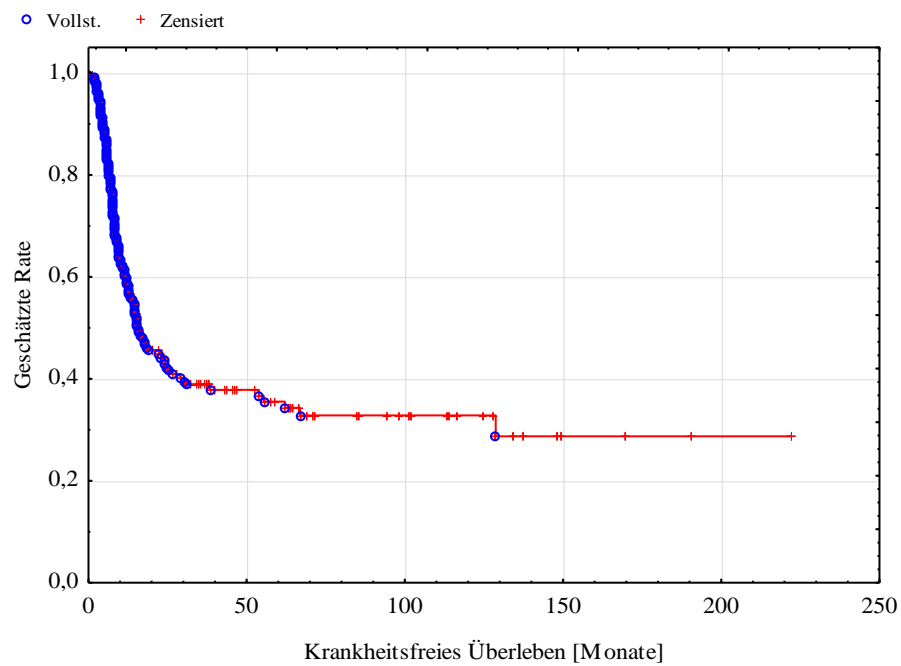


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Schätzer für das krankheitsfreie Überleben des Gesamtkollektivs

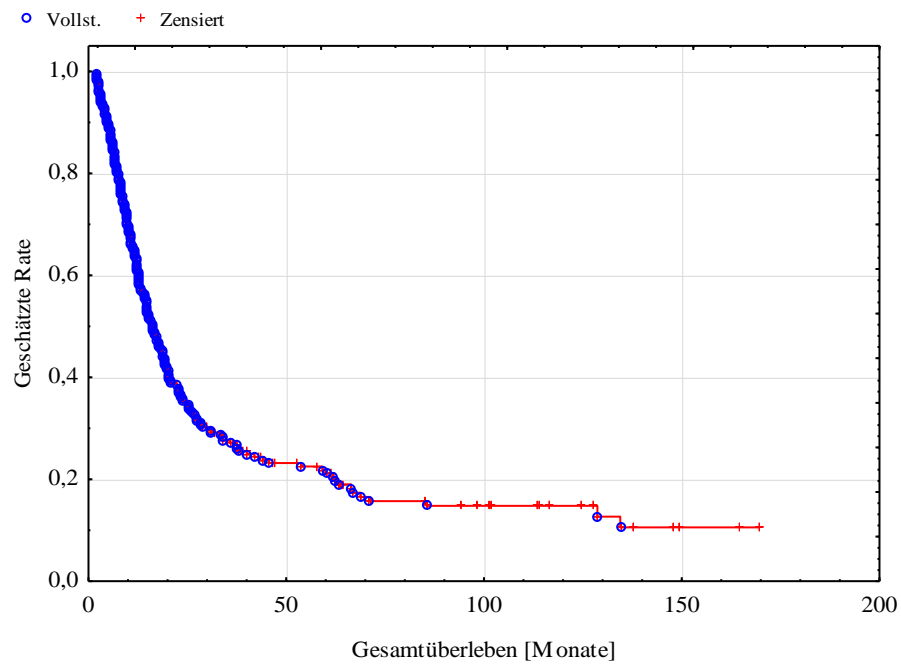


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs

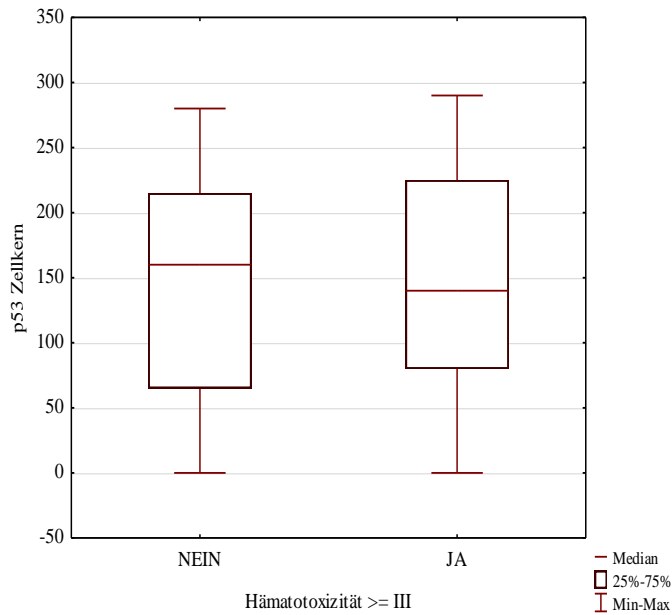


Abbildung 31: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität

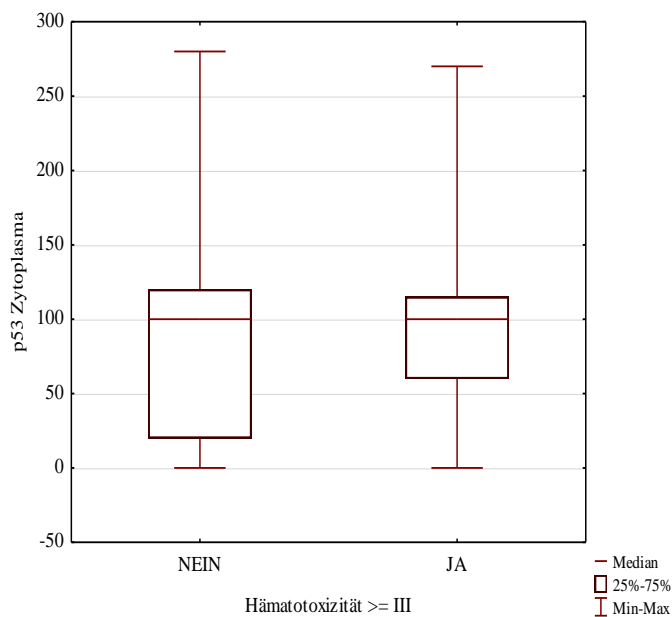


Abbildung 32: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität

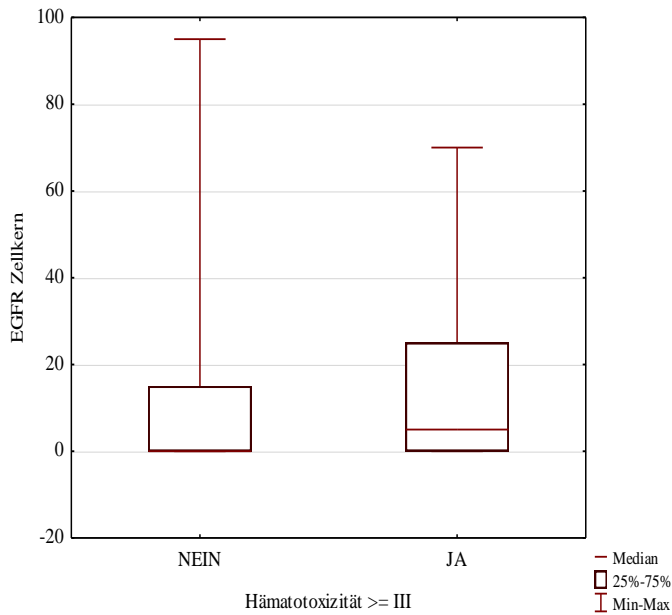


Abbildung 33: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität

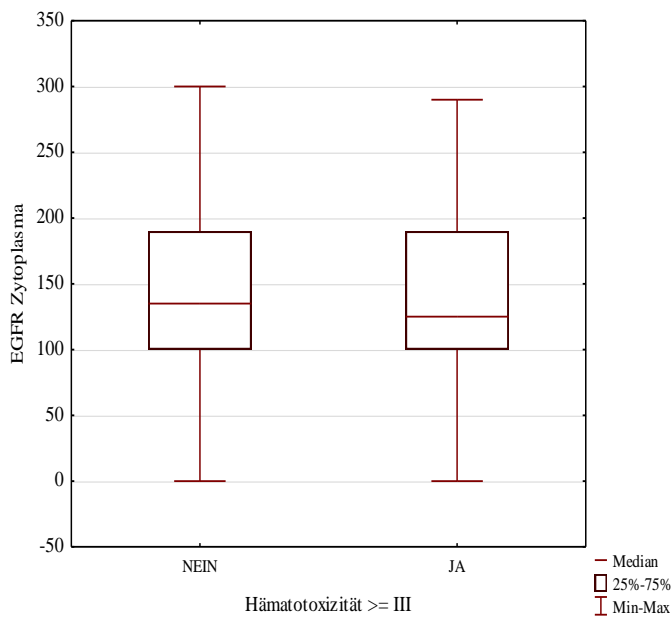
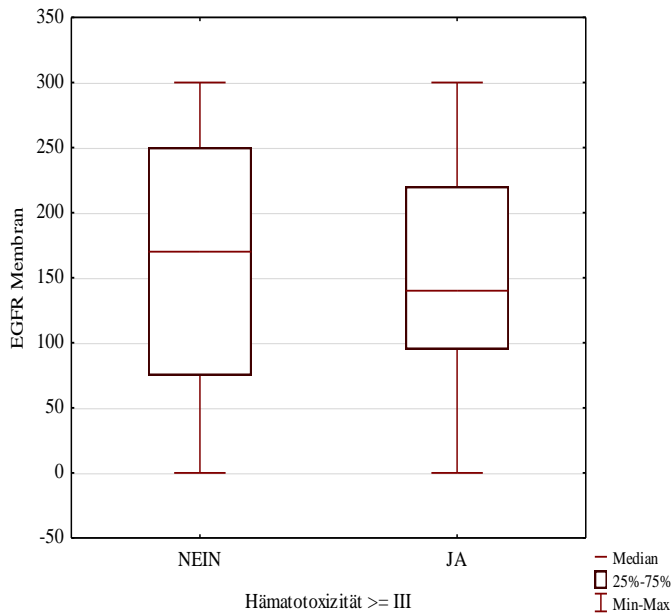


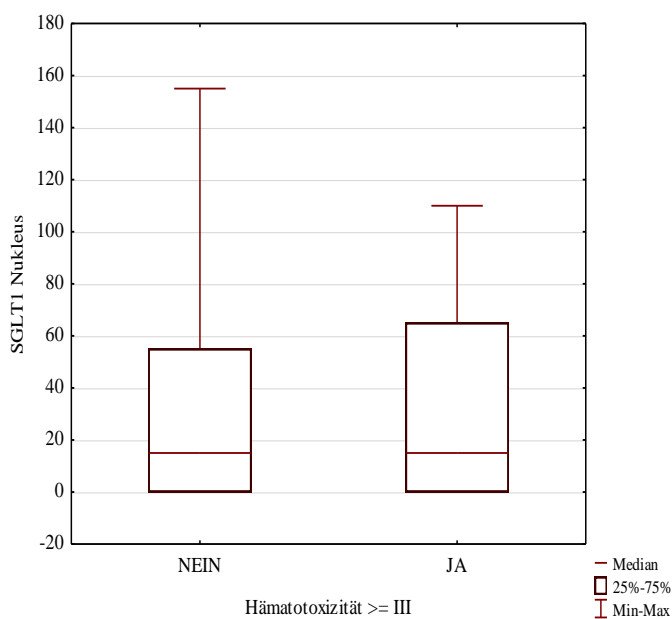
Abbildung 34: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität



n	Hämatotoxizitätsgrad	
	<III	≥III
Maximum	300	300
75%-Quantil	250	220
Median	170	140
25%-Quantil	75	95
Minimum	0	0

p = 0,82

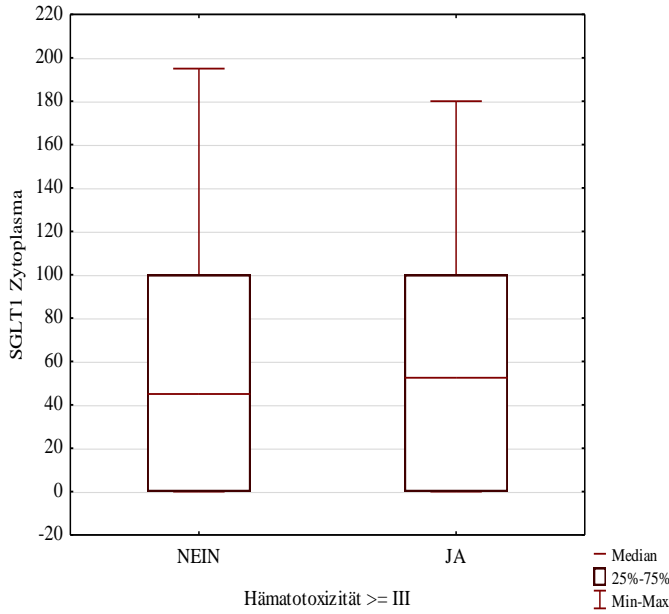
Abbildung 35: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität



n	Hämatotoxizitätsgrad	
	<III	≥III
Maximum	155	110
75%-Quantil	55	65
Median	15	15
25%-Quantil	0	0
Minimum	0	0

p = 0,82

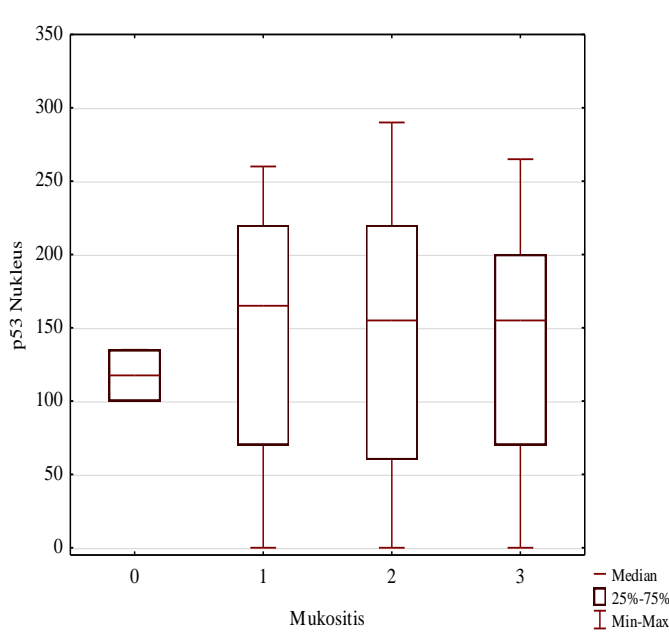
Abbildung 36: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Hämatotoxizität



Hämatoxizitätsgrad		
	<III	≥III
n	191	42
Maximum	195	180
75%-Quantil	100	100
Median	45	52,5
25%-Quantil	0	0
Minimum	0	0

p = 0,93

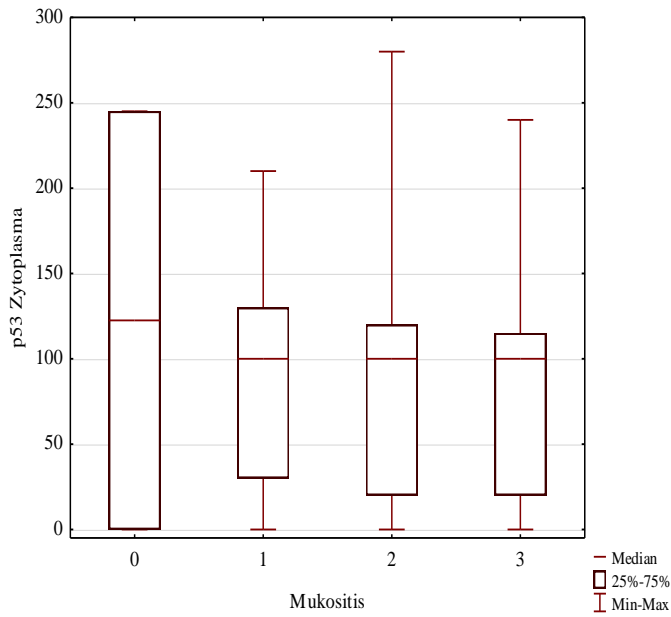
Abbildung 37: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Hämatoxizität



Mukositis[Grad]				
	0	1	2	3
n	2	58	13	42
			1	
Maximum	135	26	26	26
75%-Quantil	135	22	22	20
Median	117,5	16	15	15
25%-Quantil	100	70	60	70
Minimum	100	0	0	0

p = 0,91

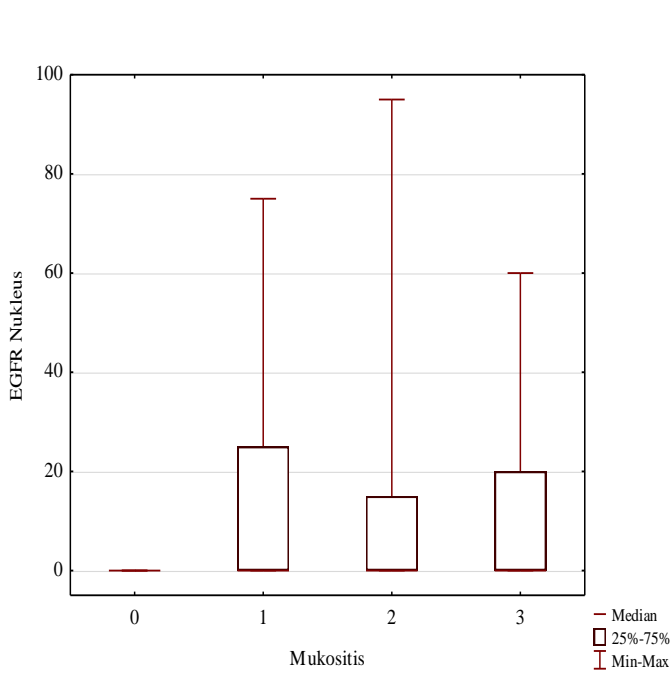
Abbildung 38: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3



	Mukositis[Grad]			
	0	1	2	3
n	2	58	13	42
			1	
Maximum	245	21	28	24
m		0	0	0
75%-Quantil	245	13	12	11
Median	112,5	10	10	10
25%-Quantil	0	30	20	20
Minimum	0	0	0	0

p = 0,98

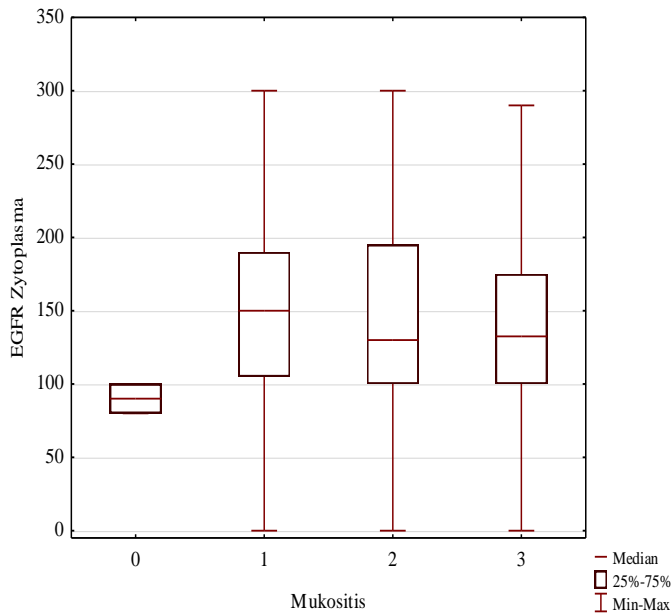
Abbildung 39: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3



	Mukositis[Grad]			
	0	1	2	3
n	2	58	131	42
Maximum	0	75	95	60
75%-Quantil	135	25	15	20
Median	0	0	0	0
25%-Quantil	0	0	0	0
Minimum	0	0	0	0

p = 0,8

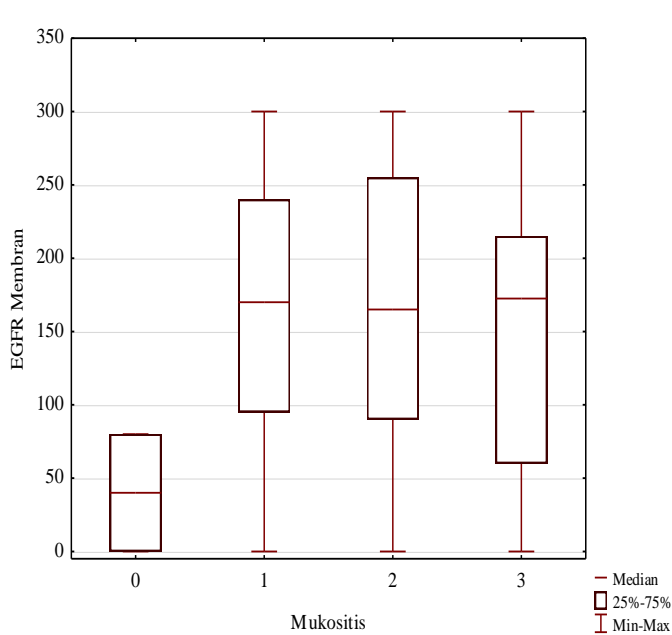
Abbildung 40: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3



	Mukositis[Grad]			
	0	1	2	3
n	2	58	13	42
			1	
Maximum	10	30	30	290
m	0	0	0	
75%-Quantil	10	19	19	175
Median	90	15	13	132,5
		0	0	5
25%-Quantil	80	10	10	100
Minimum	80	0	0	0

p = 0,96

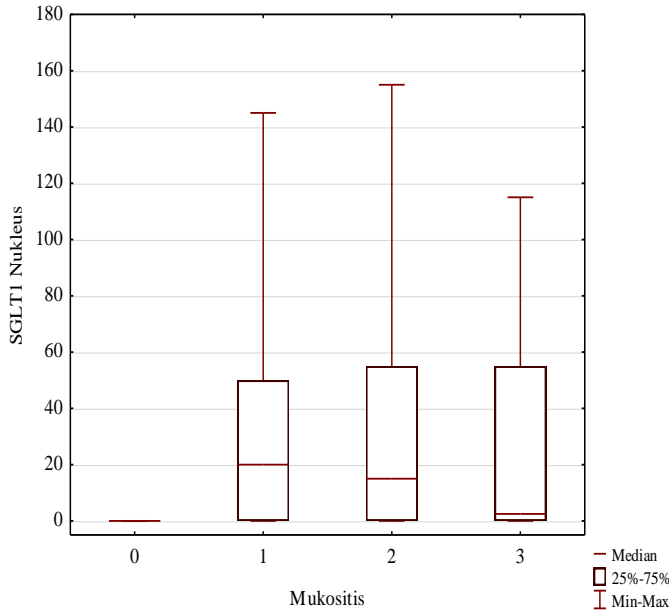
Abbildung 41: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3



	Mukositis[Grad]			
	0	1	2	3
n	2	58	131	42
Maximum	80	300	300	300
75%-Quantil	80	240	255	215
Median	40	170	165	172,5
25%-Quantil	0	95	90	60
Minimum	0	0	0	0

p = 0,78

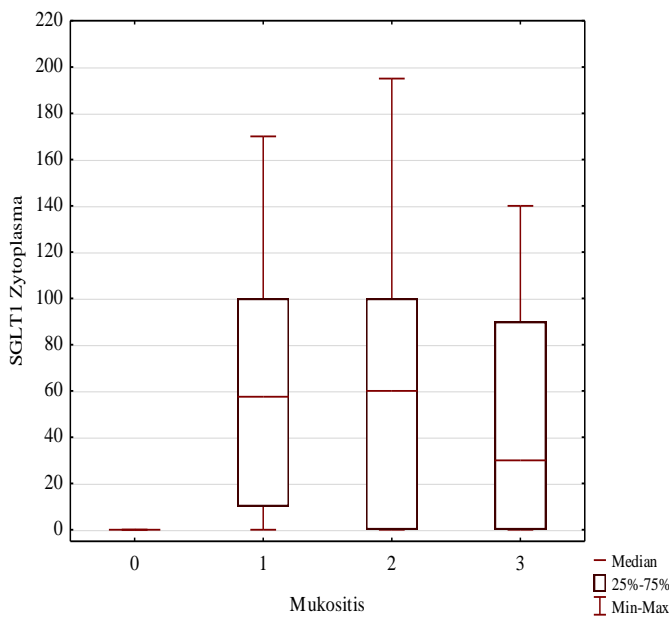
Abbildung 42: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3



	Mukositis[Grad]			
	0	1	2	3
n	2	58	131	42
Maximum	0	145	155	115
75%-Quantil	0	50	55	55
Median	0	20	15	2,5
25%-Quantil	0	0	0	0
Minimum	0	0	0	0

p = 0,35

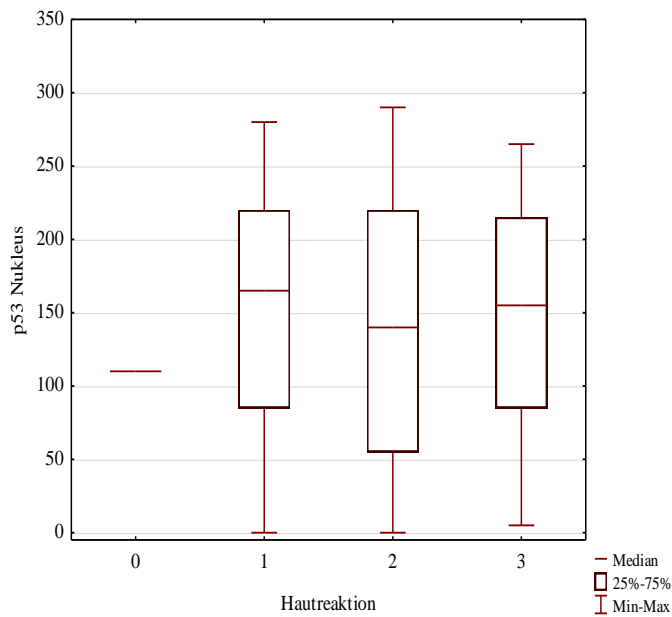
Abbildung 43: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3



	Mukositis[Grad]			
	0	1	2	3
n	2	58	131	42
Maximum	0	170	195	140
75%-Quantil	0	100	100	90
Median	0	57,5	60	30
25%-Quantil	0	10	0	0
Minimum	0	0	0	0

p = 0,36

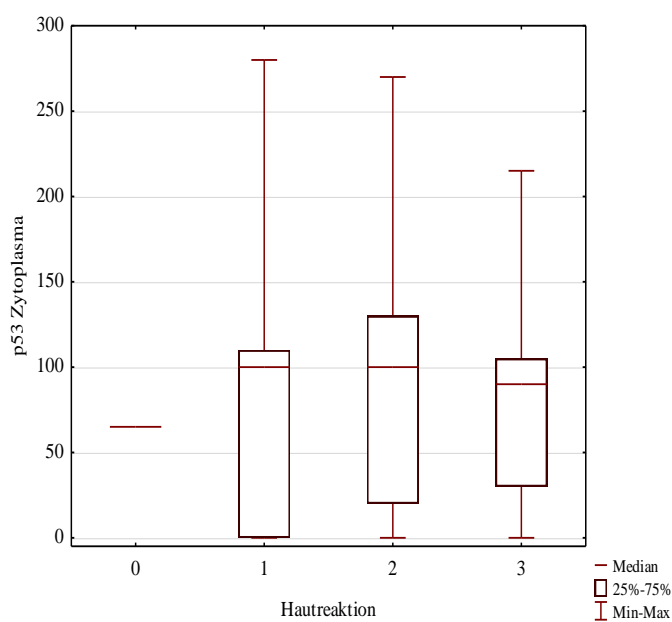
Abbildung 44: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf Mukositis Grad 0 bis 3



	Hautreaktion[Grad]			
	0	1	2	3
n	1	82	135	15
Maximum	110	280	290	265
75%-Quantil	110	220	220	215
Median	110	165	140	155
25%-Quantil	110	85	55	85
Minimum	110	0	0	5

p = 0,78

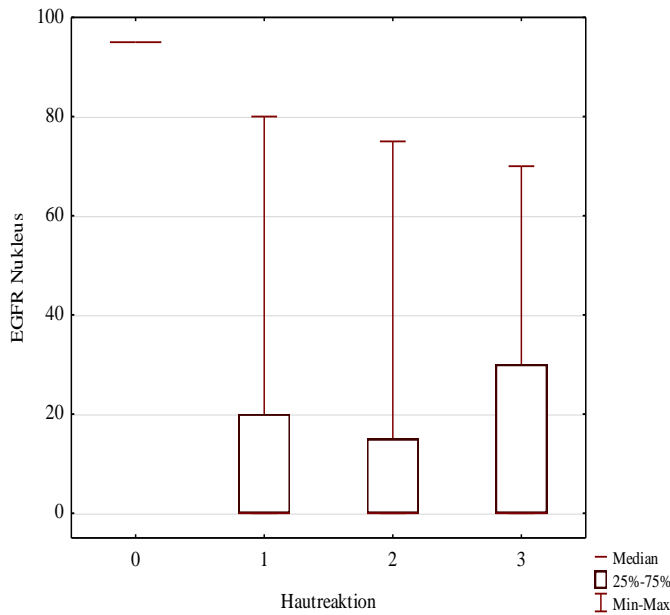
Abbildung 45: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3



	Hautreaktion[Grad]			
	0	1	2	3
n	1	82	135	15
Maximum	65	280	270	215
75%-Quantil	65	110	130	105
Median	65	100	100	90
25%-Quantil	65	0	20	30
Minimum	65	0	0	0

p = 0,41

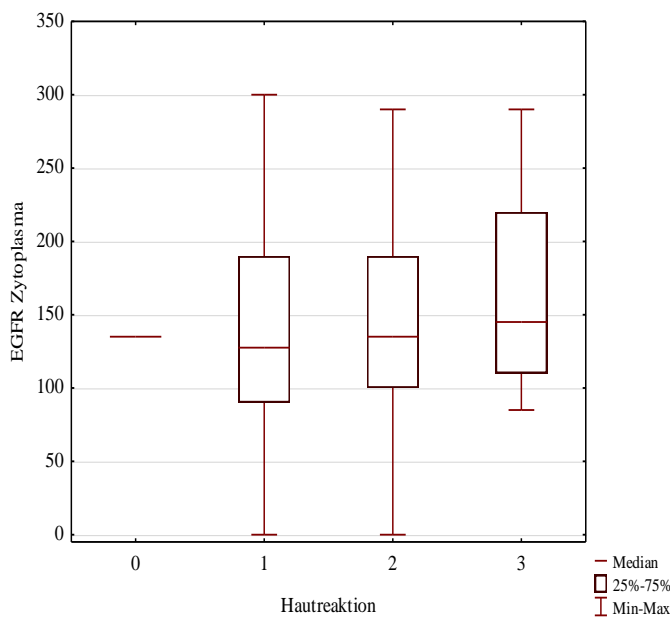
Abbildung 46: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3



	Hautreaktion[Grad]			
	0	1	2	3
n	1	82	135	15
Maximum	95	80	75	70
75%-Quantil	95	20	15	30
Median	95	0	0	0
25%-Quantil	95	0	0	0
Minimum	95	0	0	0

p = 0,53

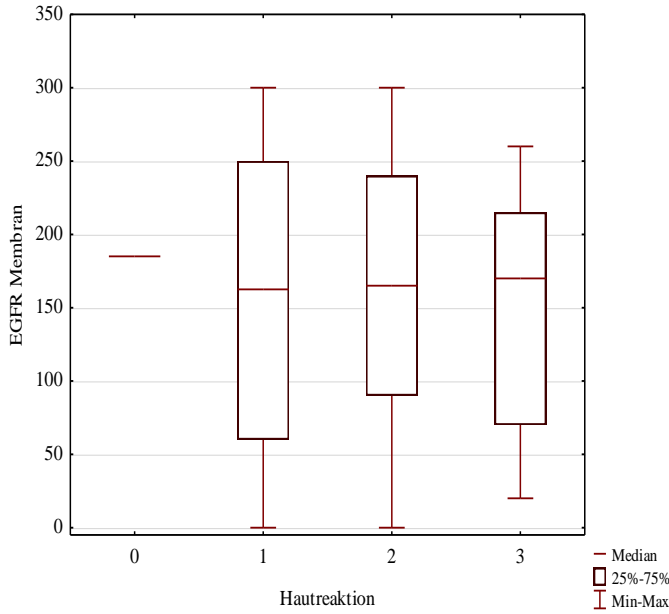
Abbildung 47: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3



	Hautreaktion[Grad]			
	0	1	2	3
n	1	82	13 5	15
Maximum	13	300	29	29
m	5		0	0
75%-Quantil	13	190	19	22
Median	13	127, 5	13	14
25%-Quantil	13	90	10	11
Minimum	13	300	29	29
	5		0	0

p = 0,29

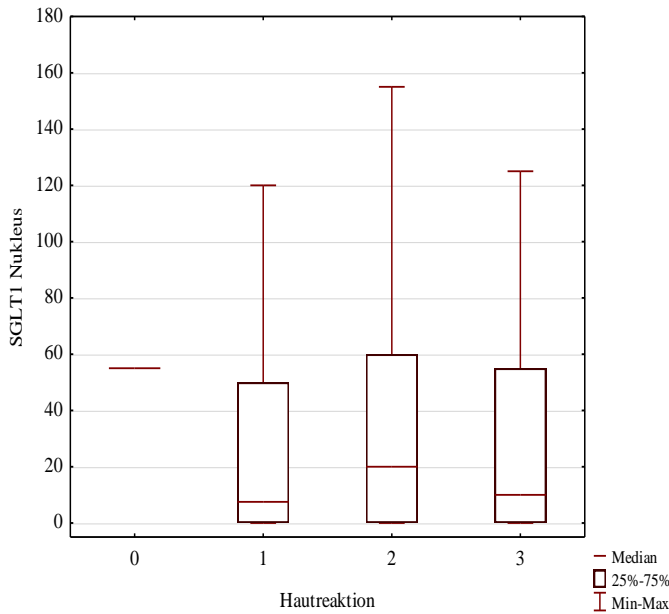
Abbildung 48: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3



	Hautreaktion[Grad]			
	0	1	2	3
n	1	82	13	15
Maximum	18	300	30	26
m	5		0	0
75%-Quantil	18	250	24	21
Median	18	162,5	16	17
25%-Quantil	5	5	5	0
Minimum	18	0	0	20

p = 0,77

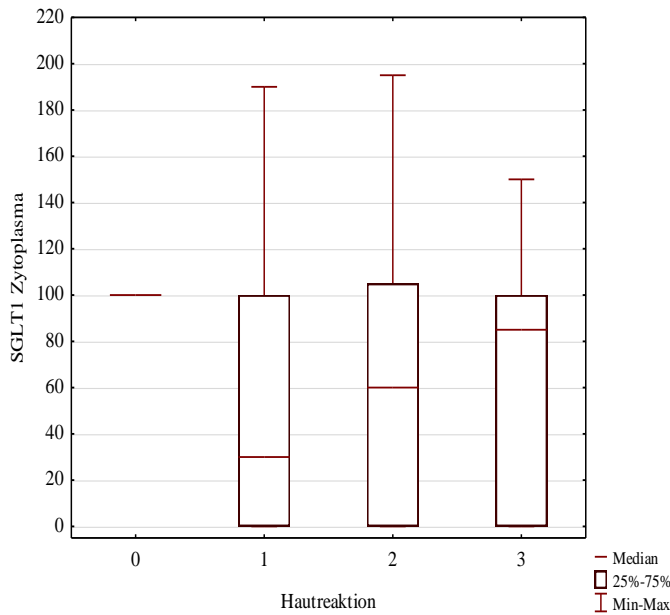
Abbildung 49: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3



	Hautreaktion[Grad]			
	0	1	2	3
n	1	82	135	15
Maximum	55	120	155	125
75%-Quantil	55	50	60	55
Median	55	7,5	20	10
25%-Quantil	55	0	0	0
Minimum	55	0	0	0

p = 0,28

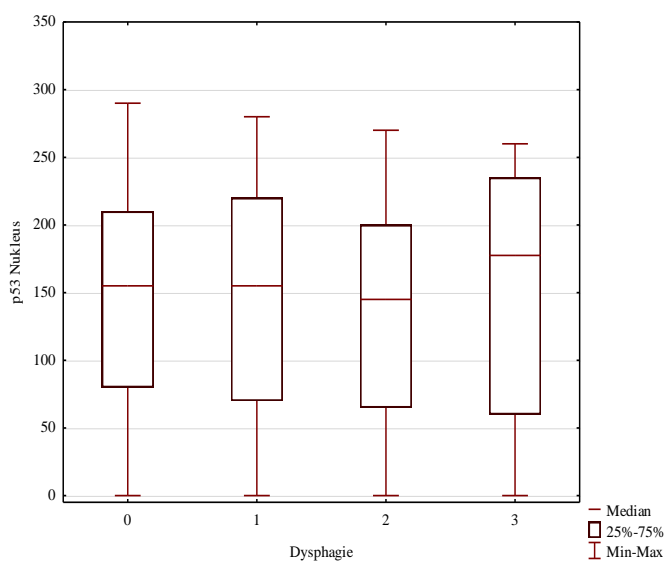
Abbildung 50: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3



	Hautreaktion[Grad]			
	0	1	2	3
n	1	82	135	15
Maximum	100	190	195	150
75%-Quantil	100	100	105	100
Median	100	30	60	85
25%-Quantil	100	0	0	0
Minimum	100	0	0	0

p = 0,23

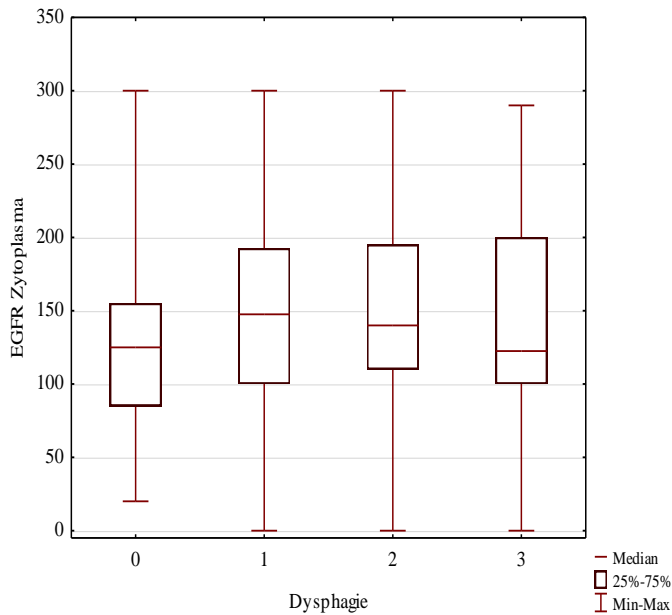
Abbildung 51: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf Hautreaktionen Grad 0 bis 3



	Dysphagie[Grad]			
	0	1	2	3
n	37	92	70	34
Maximum	290	280	270	260
75%-Quantil	210	220	200	235
Median	155	155	145	177,5
25%-Quantil	80	70	65	60
Minimum	0	0	0	0

p=0,89

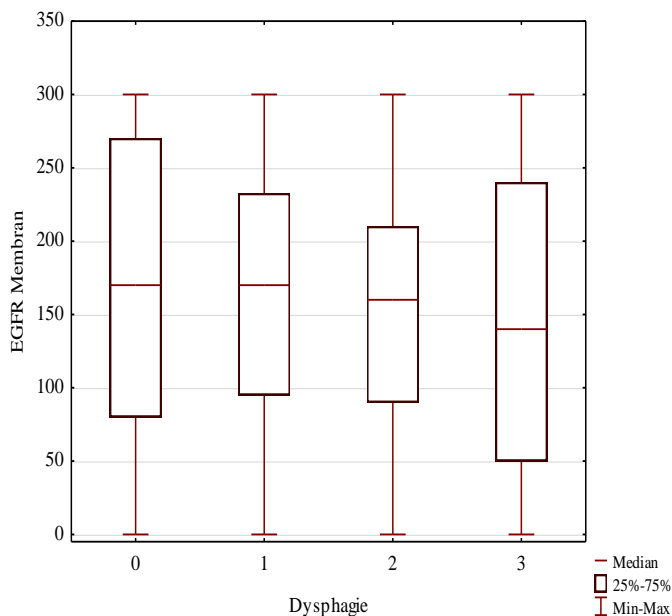
Abbildung 52: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3



	Dysphagie[Grad]			
	0	1	2	3
n	37	92	70	34
Maximum	30	300	30	290
m	0		0	
75%-Quantil	15	192,	19	200
Median	12	147,	14	122,
	5	5	0	5
25%-Quantil	85	100	11	100
Minimum	20	0	0	0

p = 0,59

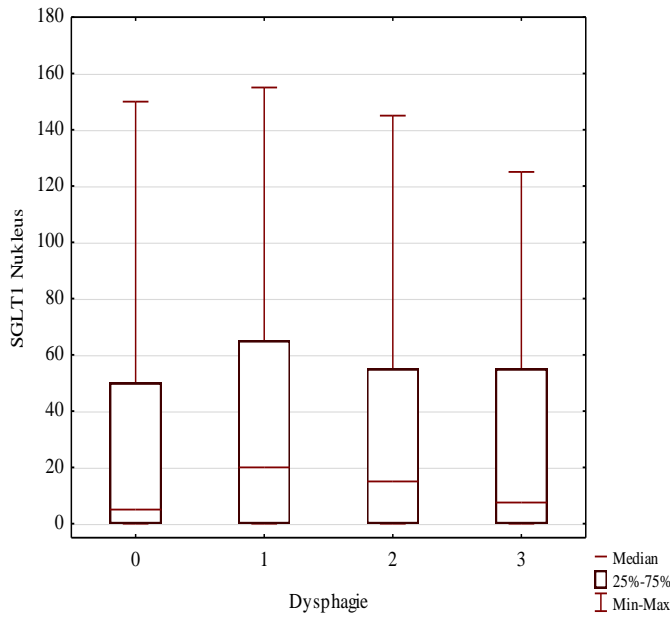
Abbildung 53: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3



	Dysphagie[Grad]			
	0	1	2	3
n	37	92	70	34
Maximum	30	300	30	30
m	0		0	0
75%-Quantil	27	232,	21	24
Median	17	170	16	14
	0		0	0
25%-Quantil	80	95	90	50
Minimum	0	0	0	0

p = 0,11

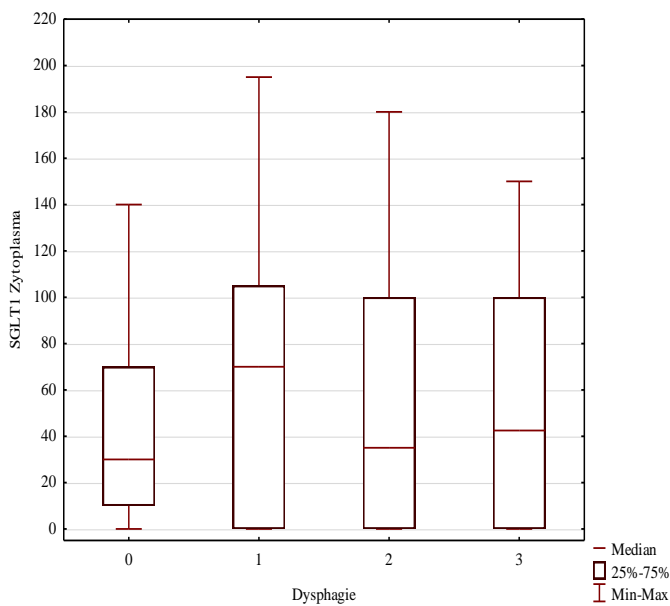
Abbildung 54: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3



	Dysphagie[Grad]			
	0	1	2	3
n	37	92	70	34
Maximum	150	155	145	125
75%-Quantil	50	65	55	55
Median	5	20	15	7,5
25%-Quantil	0	0	0	0
Minimum	0	0	0	0

p = 0,92

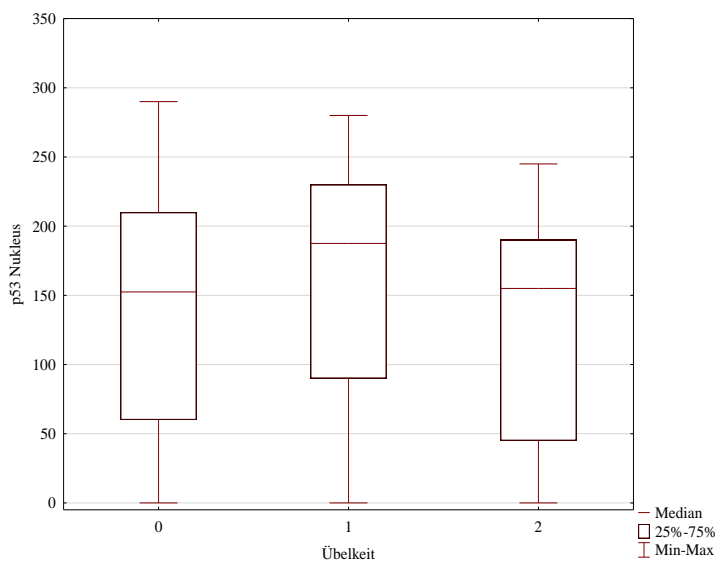
Abbildung 55: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3



	Dysphagie[Grad]			
	0	1	2	3
n	37	92	70	34
Maximum	140	195	180	150
75%-Quantil	70	105	100	100
Median	30	70	35	42,5
25%-Quantil	100	0	0	0
Minimum	0	0	0	0

p=0,96

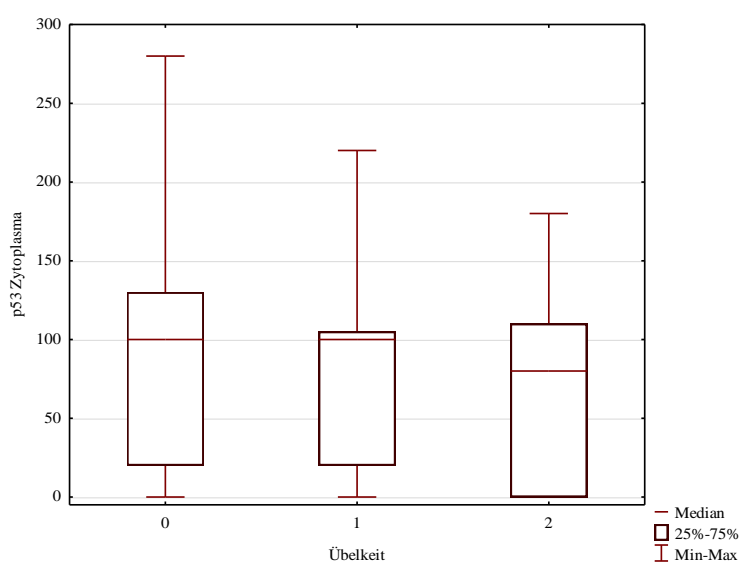
Abbildung 56: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf Dysphagie Grad 0 bis 3



	Übelkeit[Grad]		
	0	1	2
n	182	36	15
Maximum	290	280	245
75%-	210	230	190
Quantil			
Median	152,5	187,5	155
25%-	60	90	45
Quantil			
Minimum	0	0	0

p=0,41

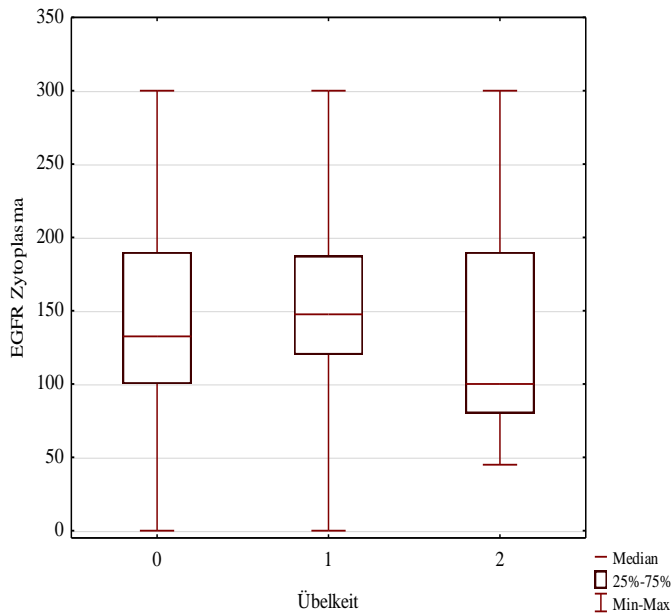
Abbildung 57: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2



	Übelkeit[Grad]		
	0	1	2
n	182	36	15
Maximum	280	220	180
75%-	130	105	110
Quantil			
Median	100	100	80
25%-	20	20	0
Quantil			
Minimum	0	0	0

p=0,23

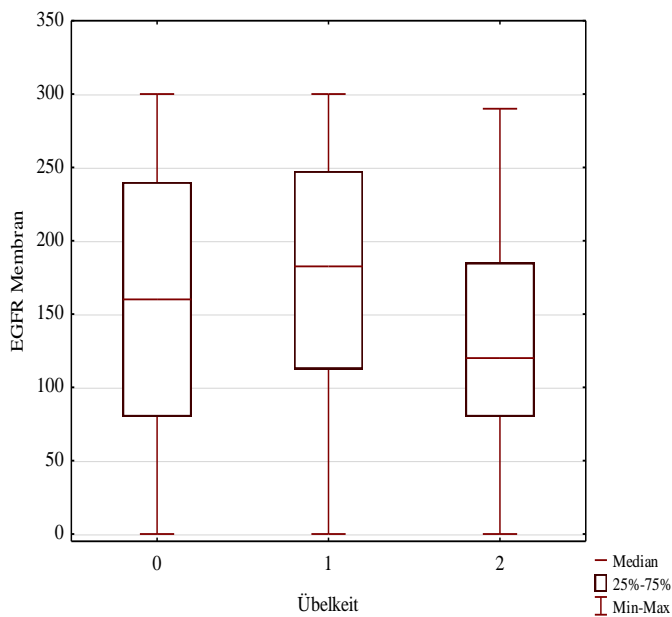
Abbildung 58: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2



	Übelkeit[Grad]		
	0	1	2
n	182	36	15
Maximum	300	300	300
75%-Quantil	190	187,5	190
Median	132,5	147,5	100
25%-Quantil	100	120	80
Minimum	0	0	45

p = 0,97

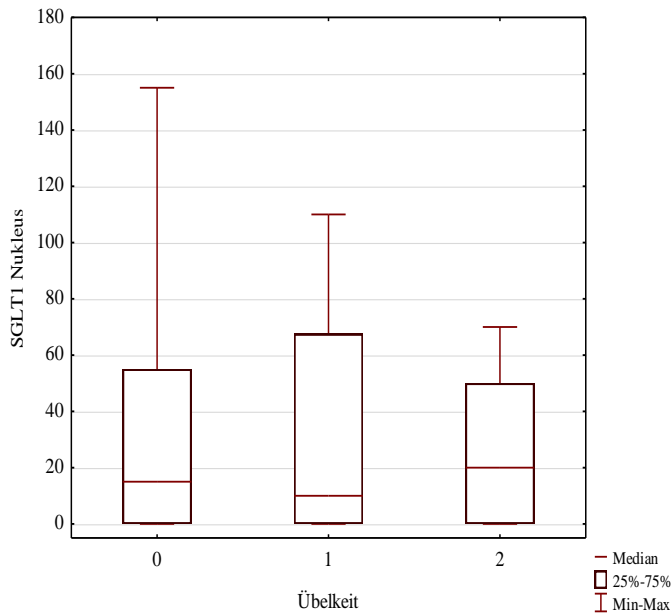
Abbildung 59: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2



	Übelkeit[Grad]		
	0	1	2
n	182	36	15
Maximum	300	300	290
75%-Quantil	240	247,5	185
Median	160	182,5	120
25%-Quantil	80	112,5	120
Minimum	0	0	0

p = 0,81

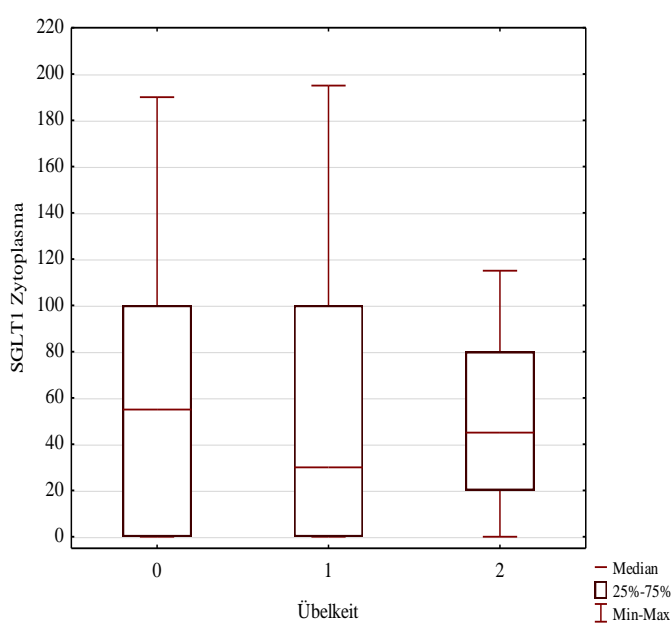
Abbildung 60: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2



	Übelkeit[Grad]		
	0	1	2
n	182	36	15
Maximum	155	110	70
75%-Quantil	55	67,5	50
Median	15	10	20
25%-Quantil	0	0	0
Minimum	0	0	0

p = 0,9

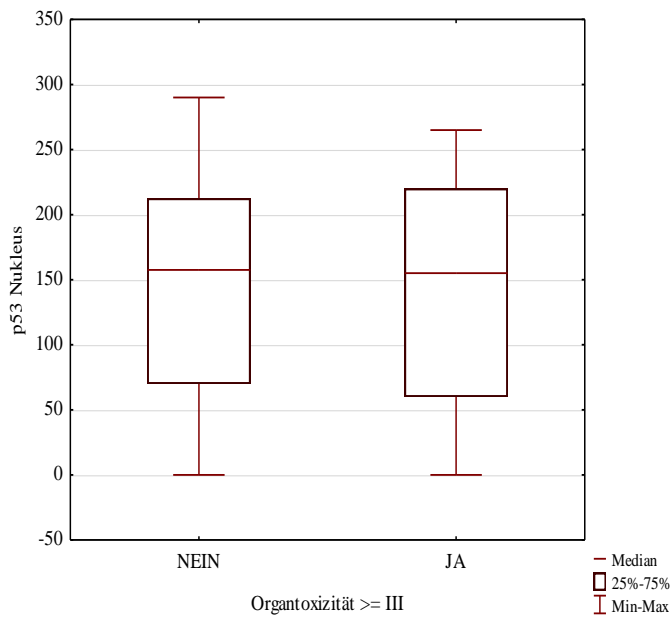
Abbildung 61: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2



	Übelkeit[Grad]		
	0	1	2
n	182	36	15
Maximum	190	195	115
75%-Quantil	100	100	80
Median	55	30	45
25%-Quantil	0	0	20
Minimum	0	0	0

p = 0,63

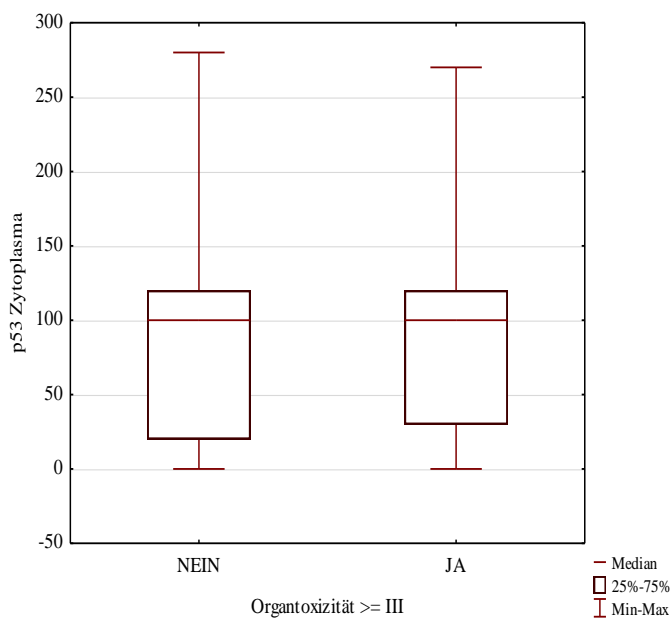
Abbildung 62: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf Übelkeit Grad 0 bis 2



Organtoxizitätsgrad		
	<III	≥III
n	156	77
Maximum	290	265
75%-Quantil	212,5	220
Median	157,5	155
25%-Quantil	70	60
Minimum	0	0

p = 0,95

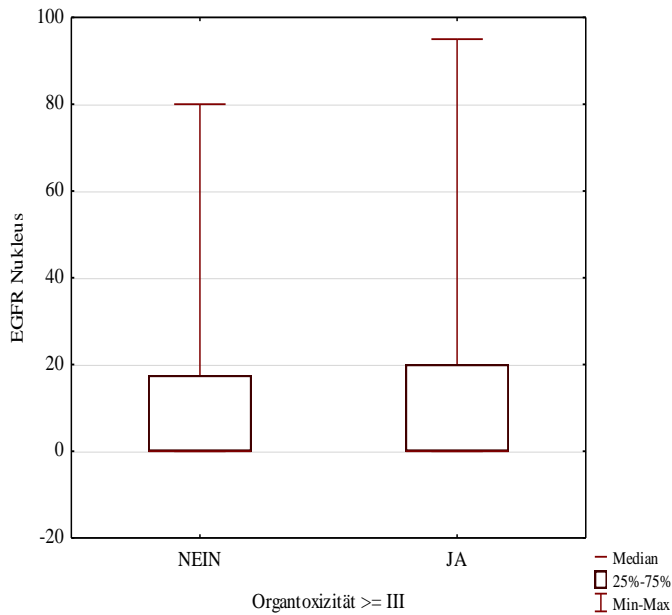
Abbildung 63: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Organtoxizität



Organtoxizitätsgrad		
	<III	≥III
n	156	77
Maximum	280	270
75%-Quantil	120	120
Median	100	100
25%-Quantil	20	30
Minimum	0	0

p = 0,19

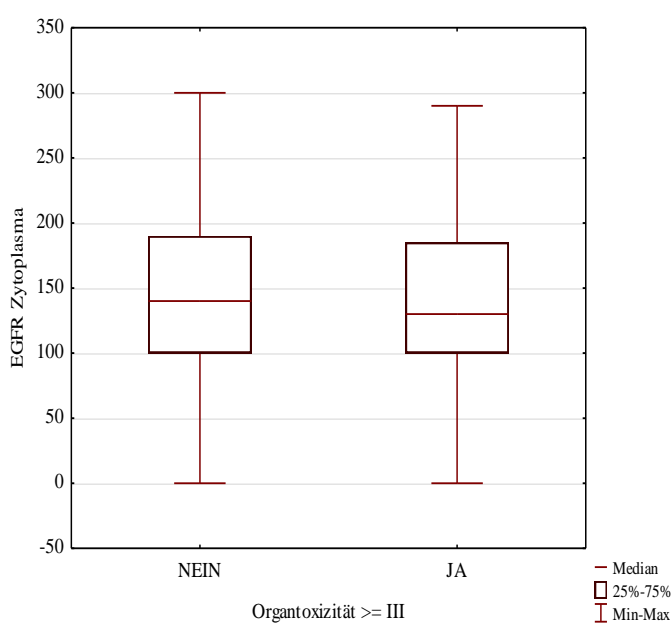
Abbildung 64: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Organtoxizität



n	Organtoxizitätsgrad	
	<III	≥III
Maximum	80	95
75%-Quantil	17,3	20
Median	0	0
25%-Quantil	0	0
Minimum	0	0

p = 0,73

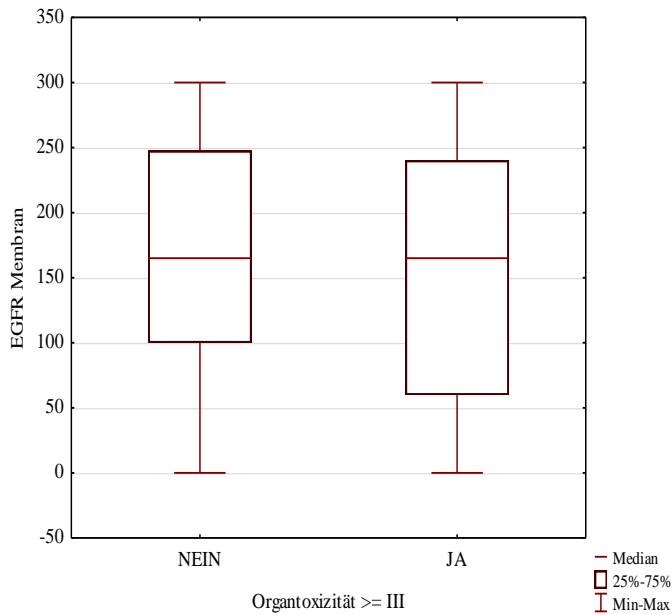
Abbildung 65: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Organtoxizität



n	Organtoxizitätsgrad	
	<III	≥III
Maximum	300	290
75%-Quantil	190	185
Median	140	130
25%-Quantil	100	100
Minimum	0	0

p = 0,94

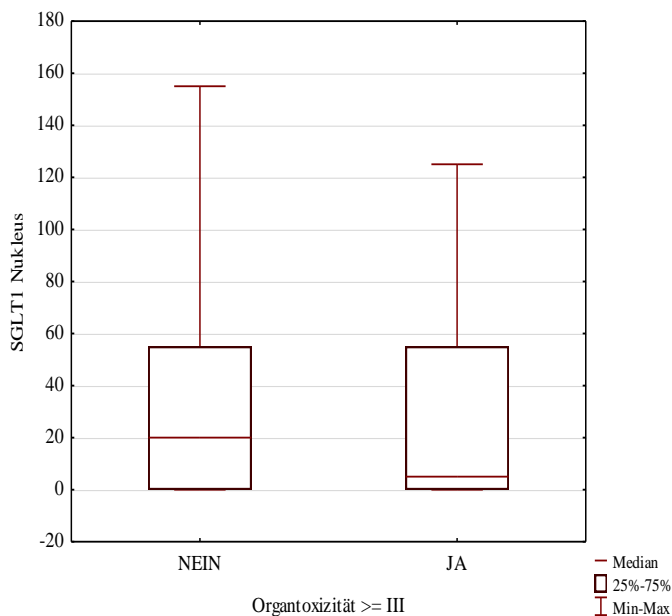
Abbildung 66: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Organtoxizität



Organtoxizitätsgrad		
	<III	≥III
n	156	77
Maximum	300	300
75%-Quantil	247,5	240
Median	160	160
25%-Quantil	100	60
Minimum	0	0

p = 0,34

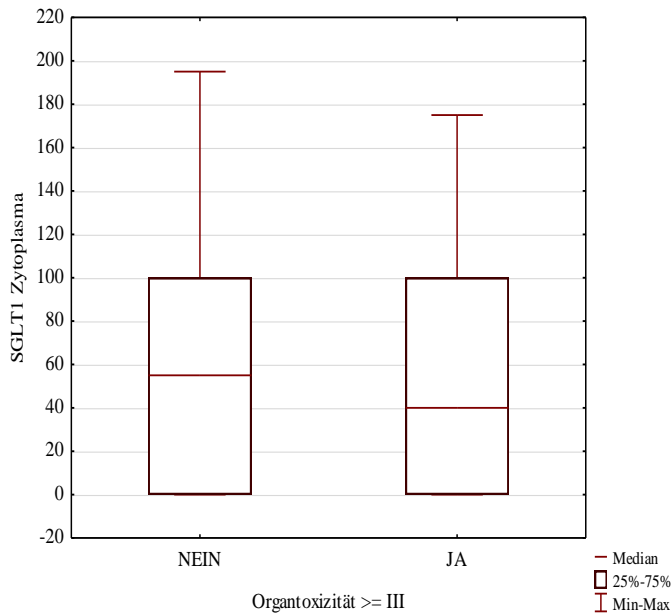
Abbildung 67: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf höhergradige Organtoxizität



Organtoxizitätsgrad		
	<III	≥III
n	156	77
Maximum	155	125
75%-Quantil	55	55
Median	20	5
25%-Quantil	0	0
Minimum	0	0

p = 0,19

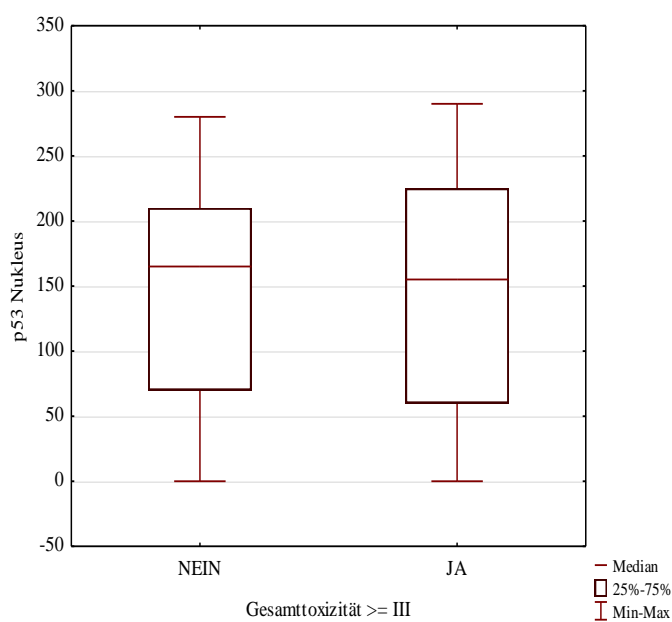
Abbildung 68: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Organtoxizität



Organtoxizitätsgrad		
	<III	≥III
n	156	77
Maximum	195	175
75%-Quantil	100	100
Median	55	40
25%-Quantil	0	0
Minimum	0	0

p = 0,77

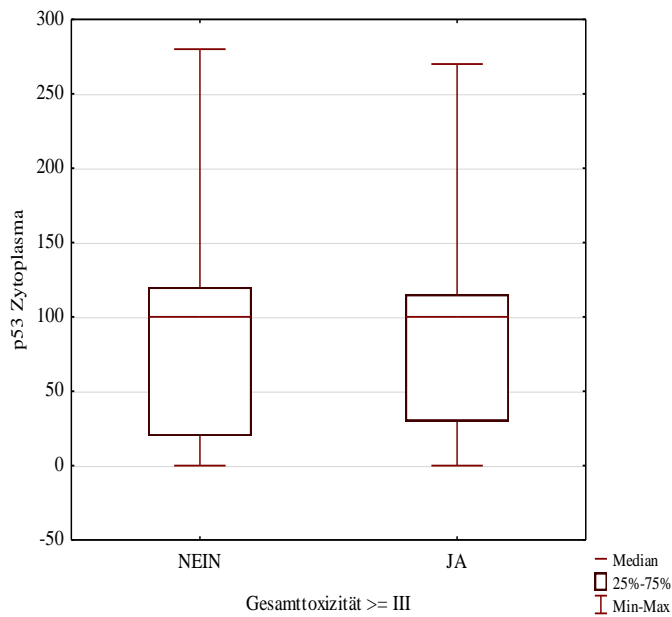
Abbildung 69: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Organtoxizität



Gesamttoxizitätsgrad		
	<III	≥III
n	130	103
Maximum	280	290
75%-Quantil	210	225
Median	165	155
25%-Quantil	70	60
Minimum	0	0

p = 0,91

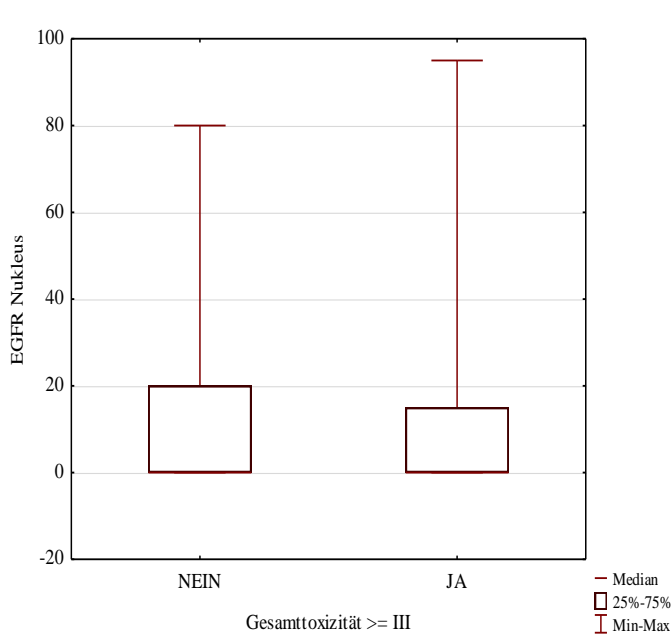
Abbildung 70: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Gesamttoxizität



Gesamttoxizitätsgrad		
	<III	≥III
n	130	103
Maximum	95	70
75%-Quantil	17,5	25
Median	0	5
25%-Quantil	0	0
Minimum	0	0

p = 0,55

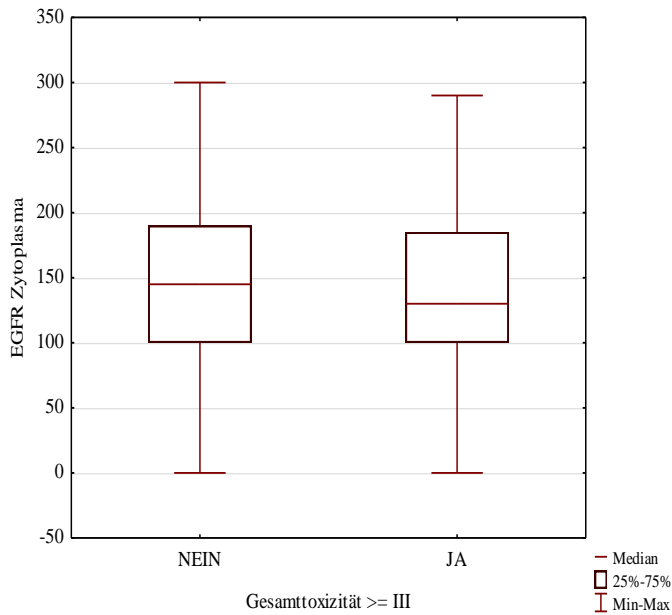
Abbildung 71: Boxplot-Analyse der p53-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Gesamttoxizität



Gesamttoxizitätsgrad		
	<III	≥III
n	130	103
Maximum	80	95
75%-Quantil	20	15
Median	0	0
25%-Quantil	0	0
Minimum	0	0

p = 0,71

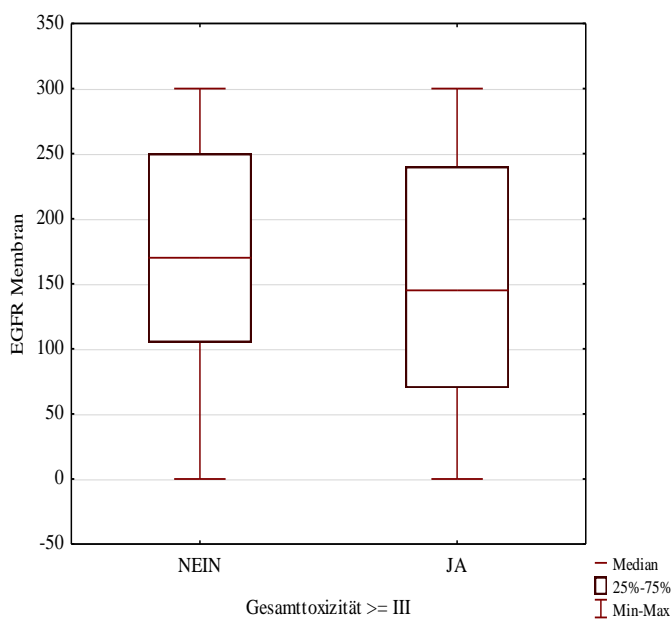
Abbildung 72: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Gesamttoxizität



Gesamttoxizitätsgrad		
	<III	≥III
n	130	103
Maximum	300	290
75%-Quantil	190	185
Median	145	130
25%-Quantil	100	100
Minimum	0	0

p = 0,51

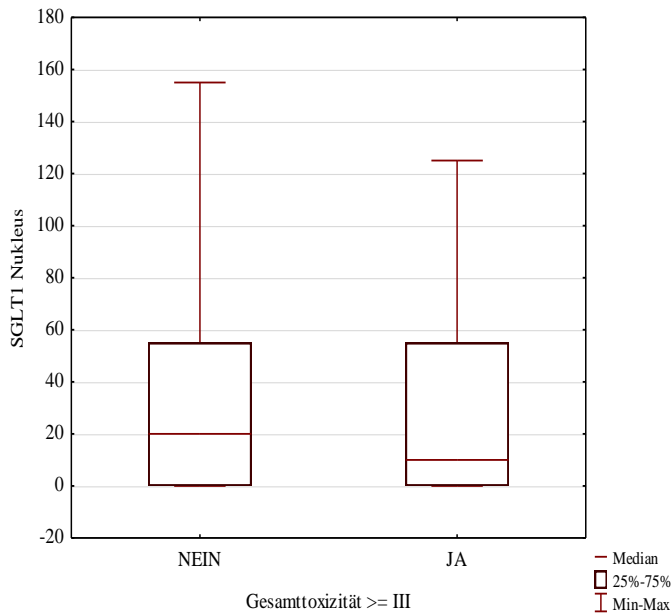
Abbildung 73: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Gesamttoxizität



Gesamttoxizitätsgrad		
	<III	≥III
n	130	103
Maximum	300	300
75%-Quantil	250	240
Median	170	145
25%-Quantil	105	70
Minimum	0	0

p = 0,4

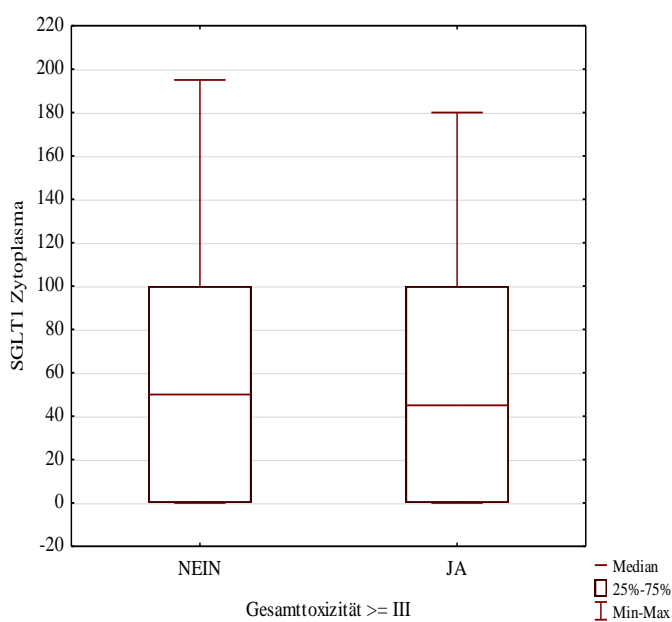
Abbildung 74: Boxplot-Analyse der EGFR-Expression in der Zellmembran bezogen auf höhergradige Gesamttoxizität



	Gesamttoxizitätsgrad	
	<III	≥III
n	130	103
Maximum	155	2125
75%-Quantil	55	55
Median	20	10
25%-Quantil	0	0
Minimum	0	0

p = 0,5

Abbildung 75: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zellkern bezogen auf höhergradige Gesamttoxizität



	Gesamttoxizitätsgrad	
	<III	≥III
n	130	103
Maximum	195	180
75%-Quantil	100	100
Median	50	45
25%-Quantil	0	0
Minimum	0	0

p = 0,93

Abbildung 76: Boxplot-Analyse der SGLT1-Expression im Zytoplasma bezogen auf höhergradige Gesamttoxizität

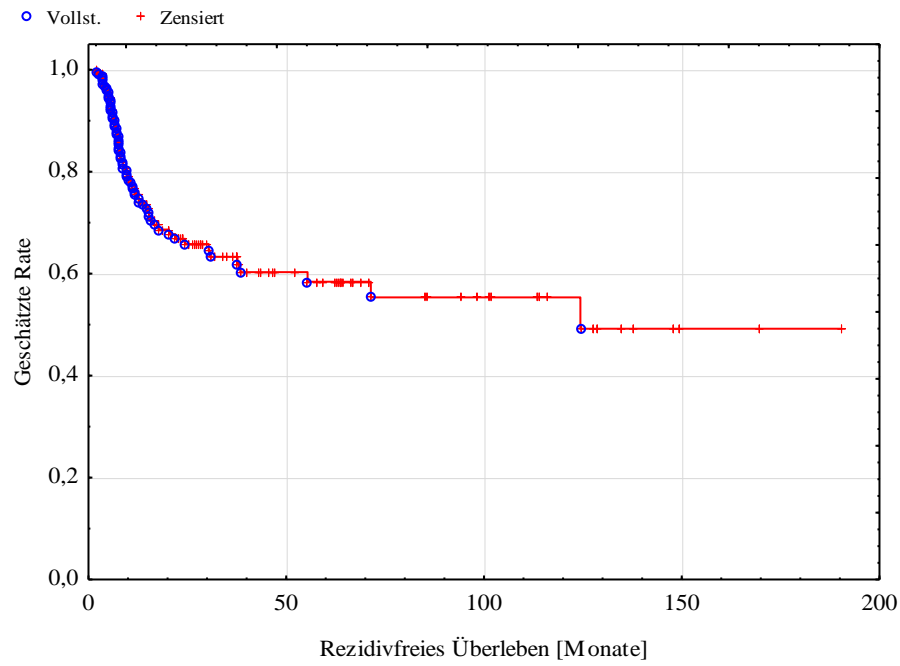


Abbildung 77: Kaplan-Meier-Schätzer für das rezidivfreie Überleben des Gesamtkollektivs

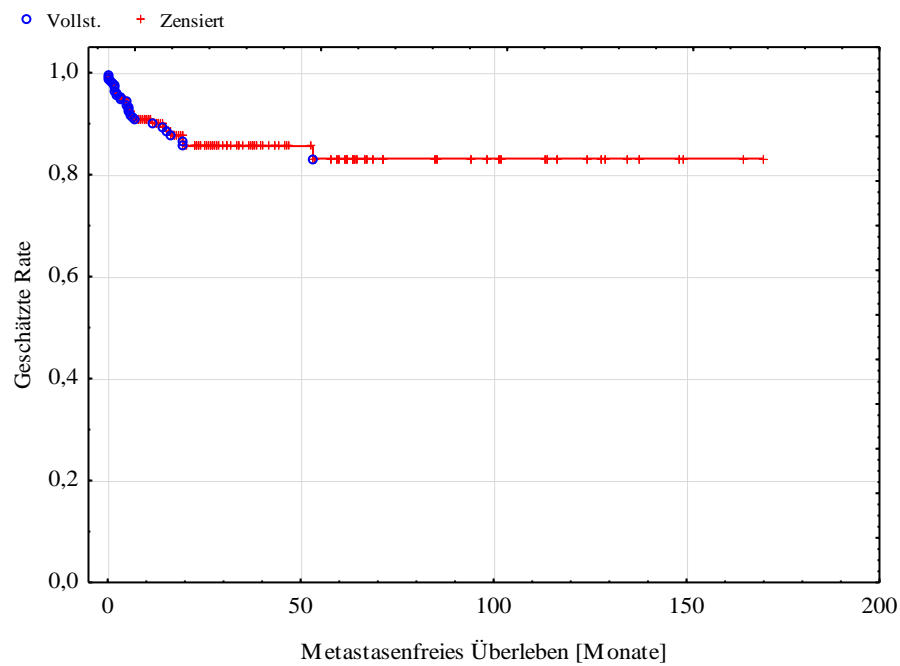


Abbildung 78: Kaplan-Meier-Schätzer für das metastasenfrees Überleben des Gesamtkollektivs

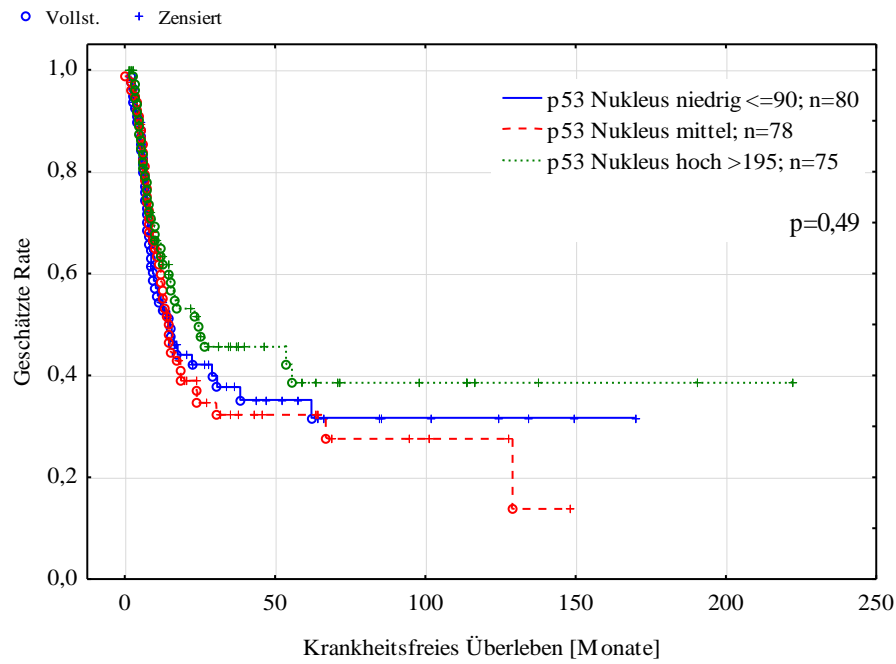


Abbildung 79: Kaplan-Meier-Schätzer für das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zellkern

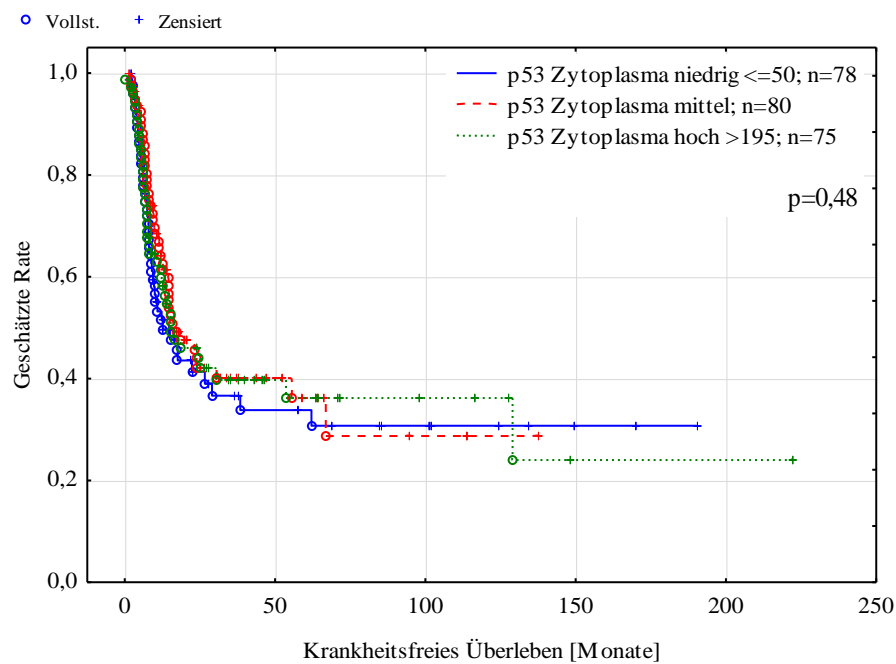


Abbildung 80: Kaplan-Meier-Schätzer für das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zytoplasma

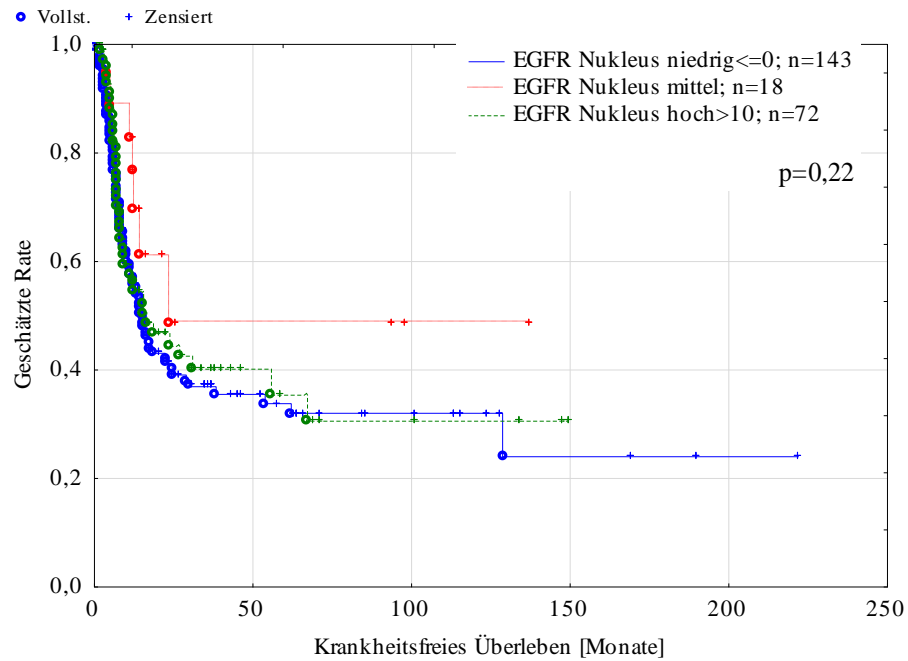


Abbildung 81: Kaplan-Meier-Schätzer für das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zellkern

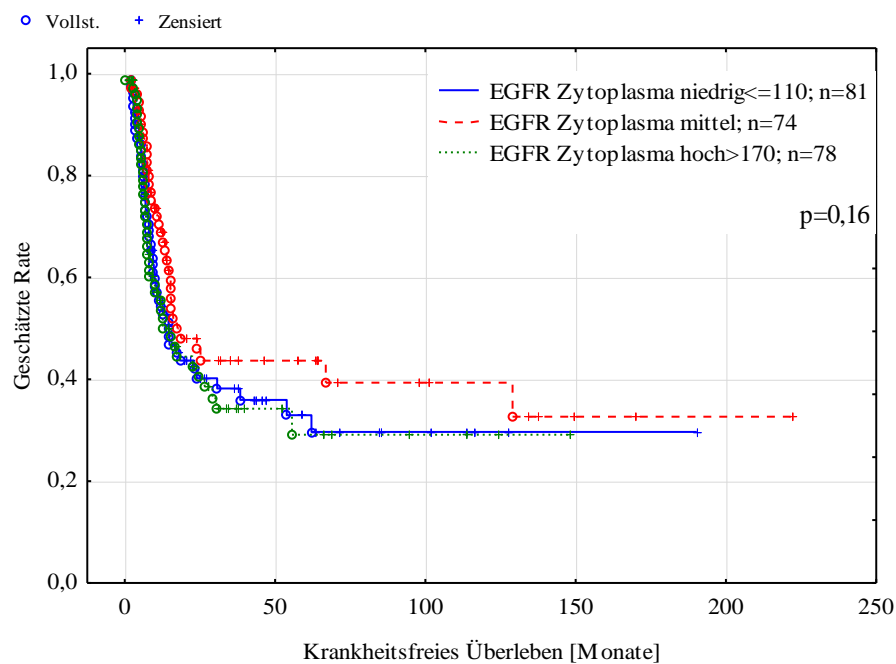


Abbildung 82: Kaplan-Meier-Schätzer für das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zytoplasma

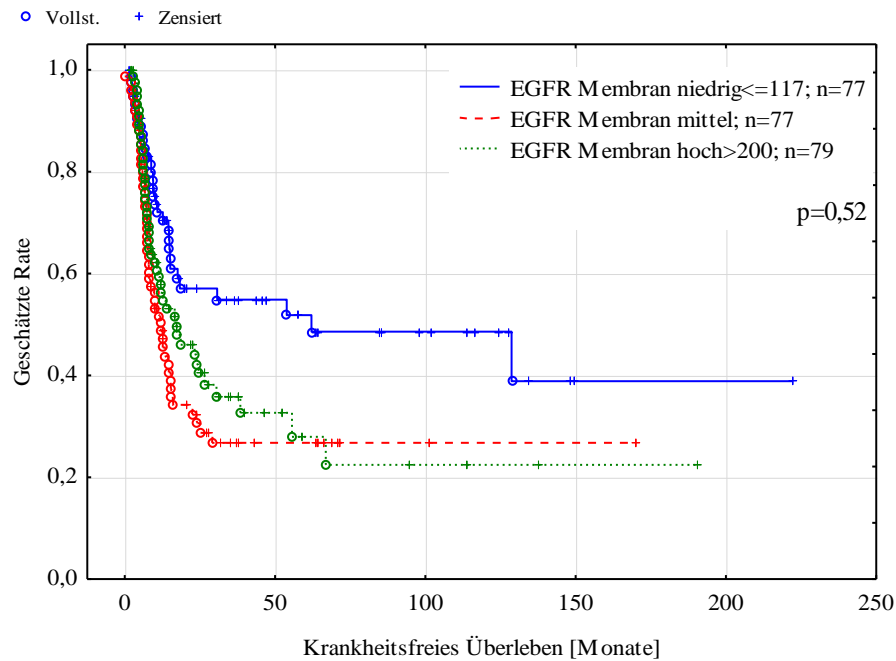


Abbildung 83: Kaplan-Meier-Schätzer für das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression in der Zellmembran

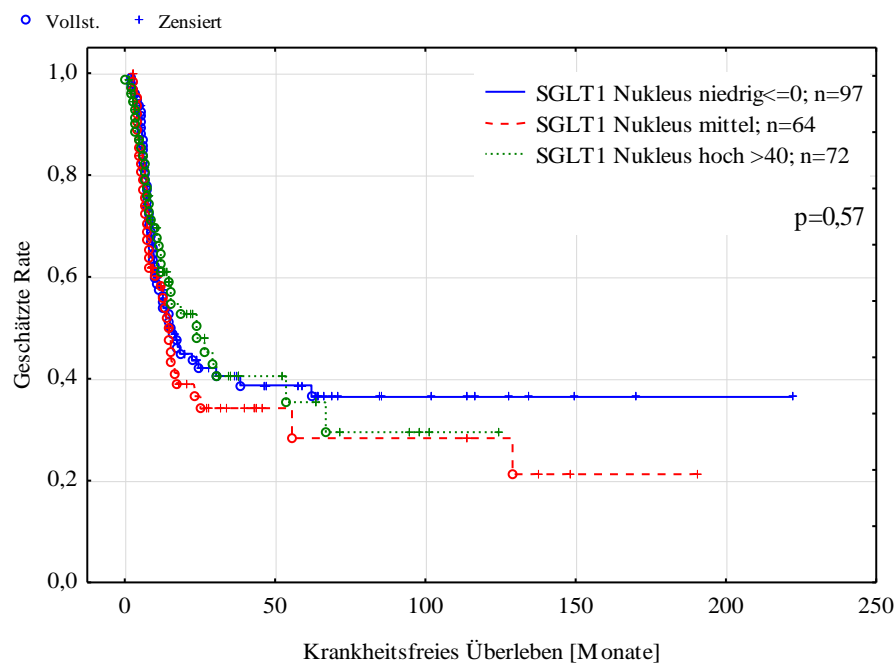


Abbildung 84: Kaplan-Meier-Schätzer für das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zellkern

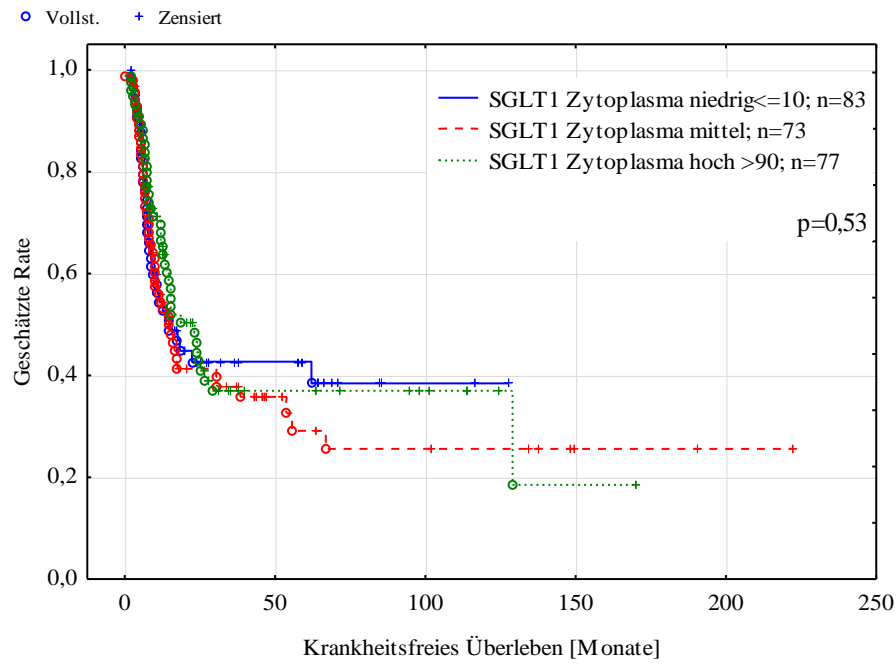


Abbildung 85: Kaplan-Meier-Schätzer für das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zytoplasma

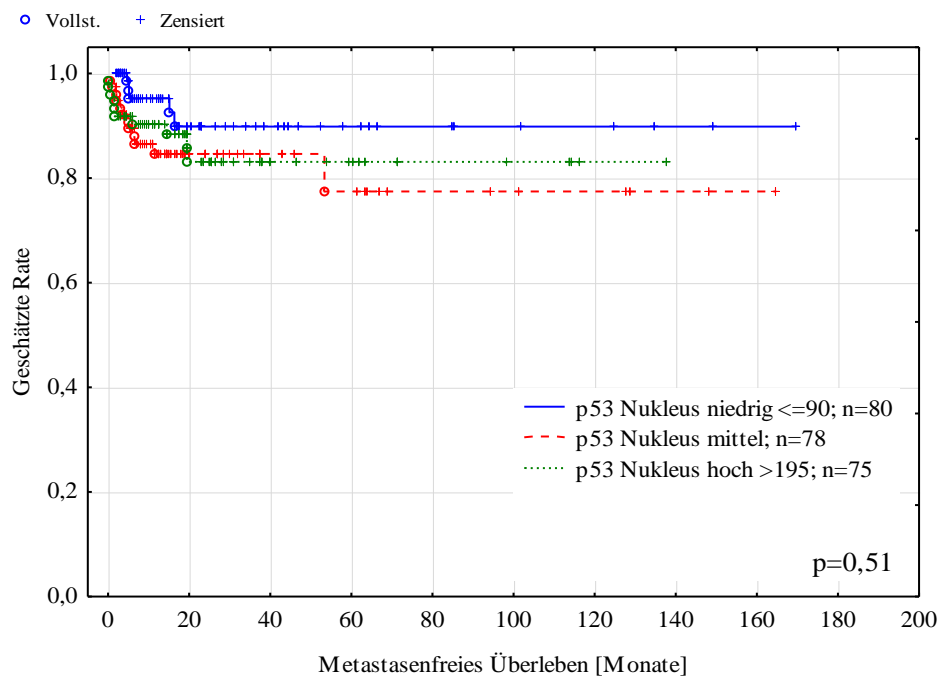


Abbildung 86: Kaplan-Meier-Schätzer für das metastasenfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zellkern

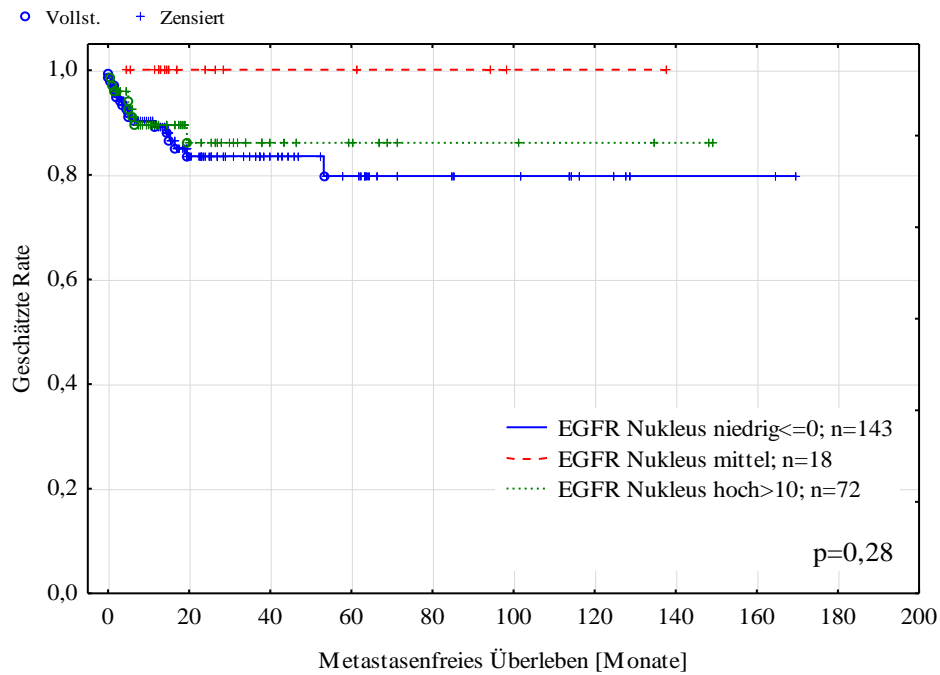


Abbildung 87: Kaplan-Meier-Schätzer für das metastasenfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zellkern

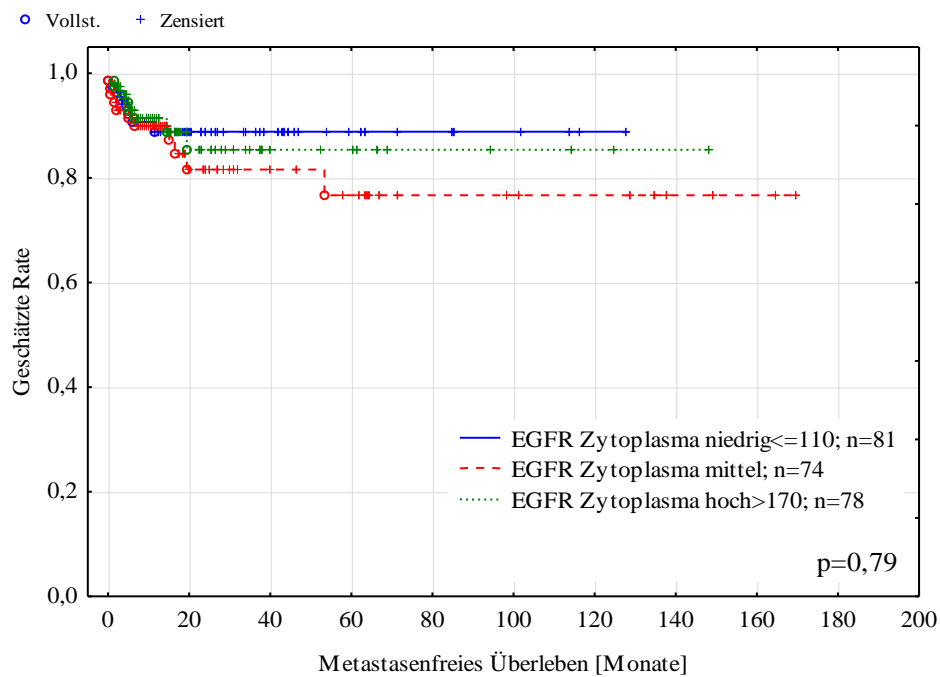


Abbildung 88: Kaplan-Meier-Schätzer für das metastasenfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zytoplasma

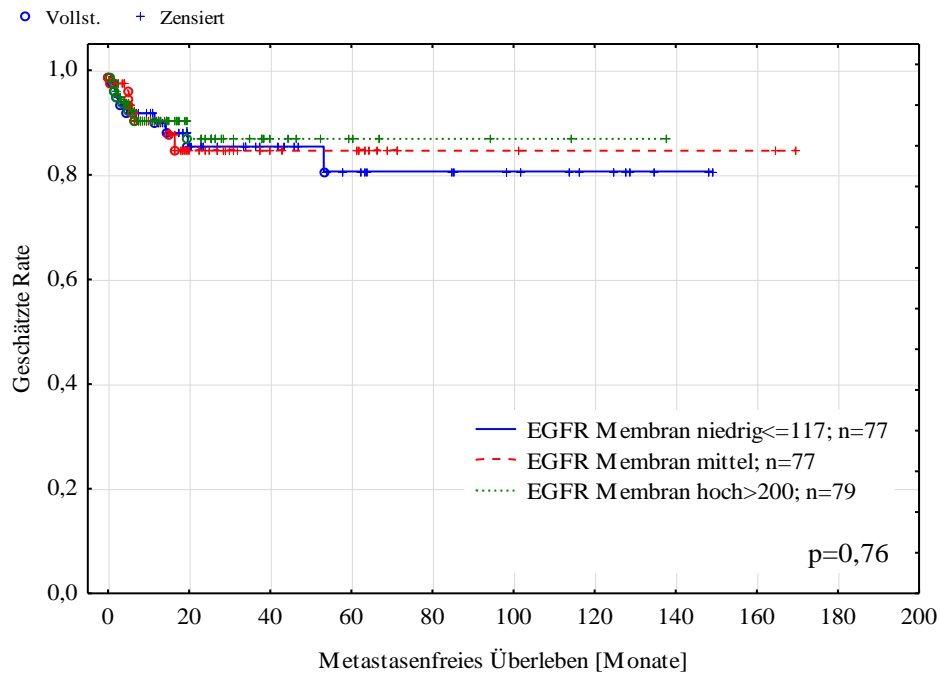


Abbildung 89: Kaplan-Meier-Schätzer für das metastasenfrees Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression in der Zellmembran

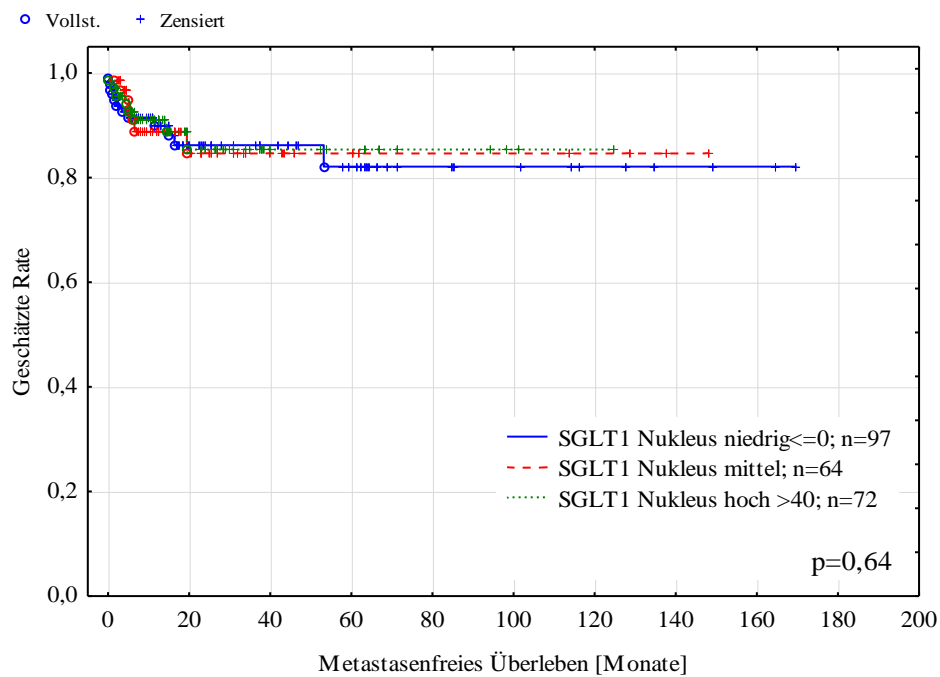


Abbildung 90: Kaplan-Meier-Schätzer für das metastasenfrees Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zellkern

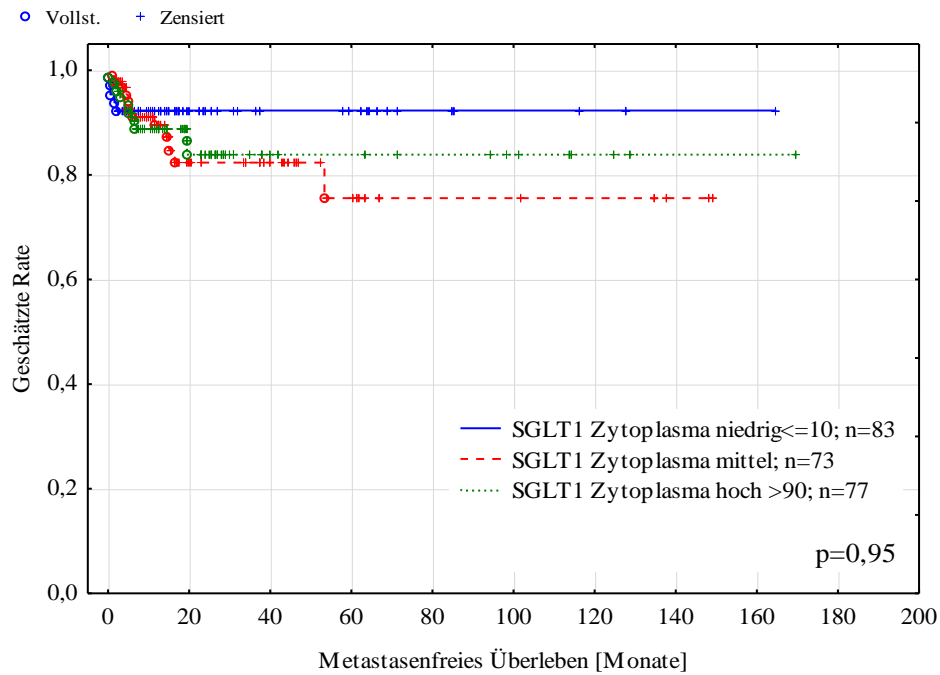


Abbildung 91: Kaplan-Meier-Schätzer für das metastasenfrees Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zytoplasma

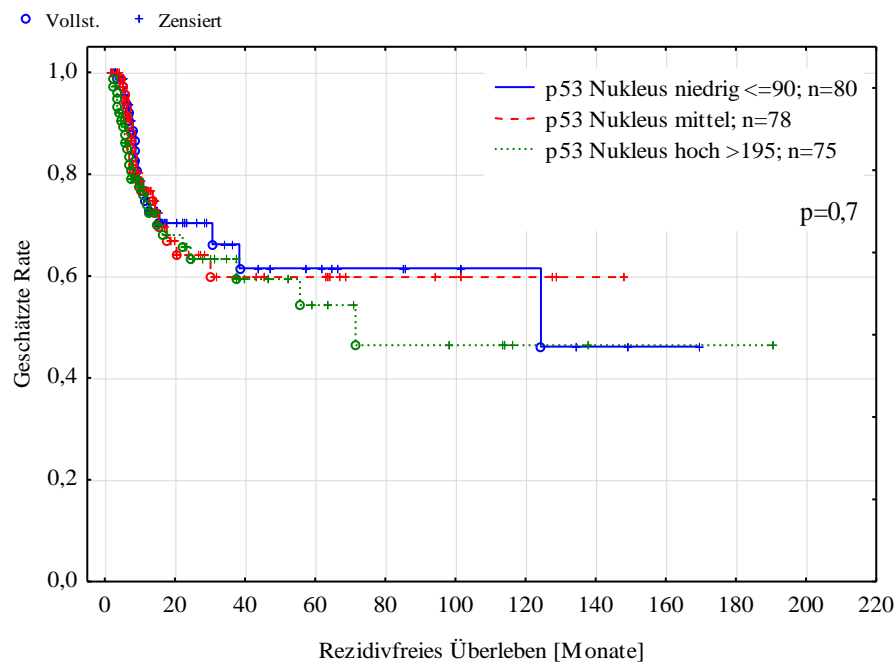


Abbildung 92: Kaplan-Meier-Schätzer für das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zellkern

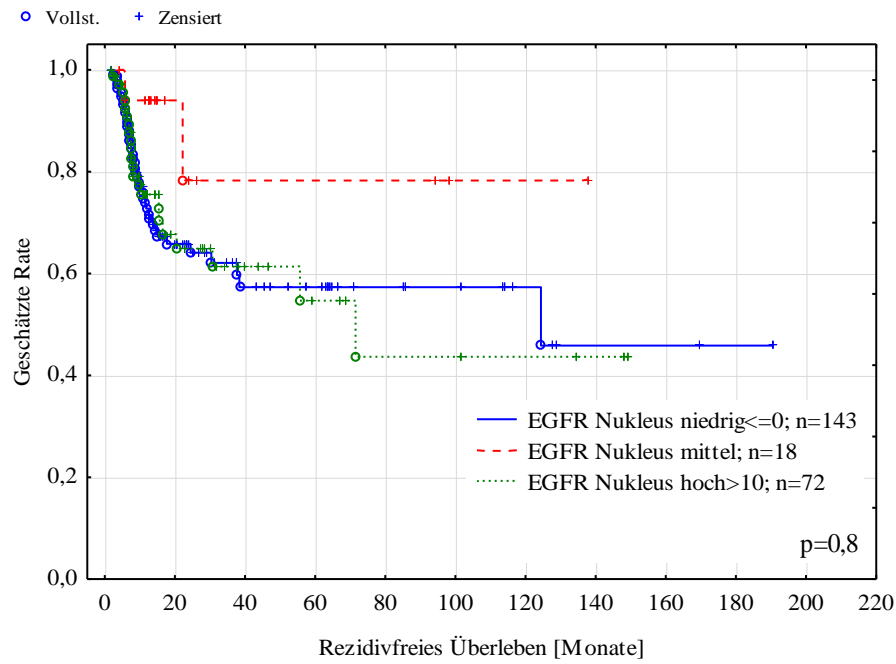


Abbildung 93: Kaplan-Meier-Schätzer für das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zellkern

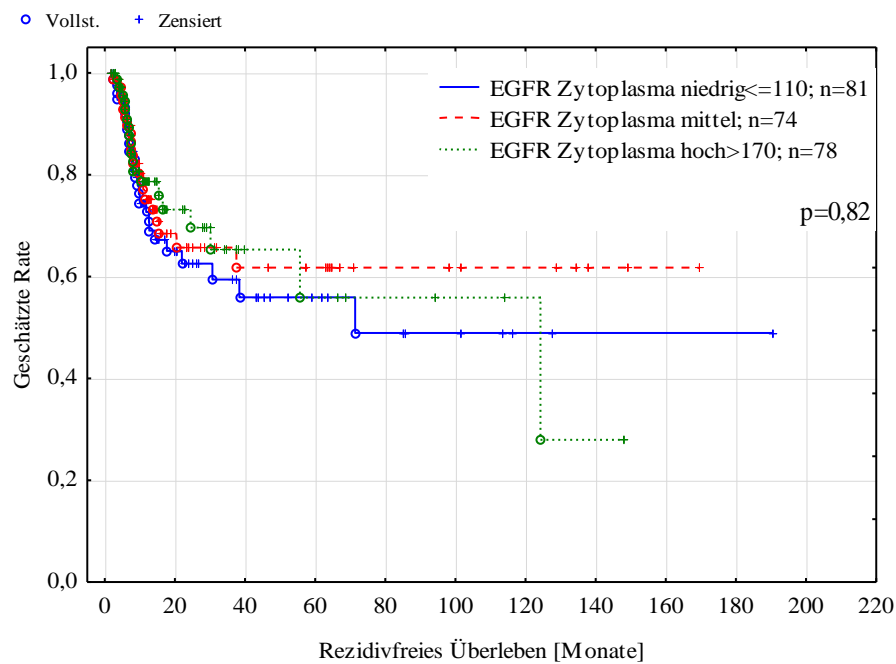


Abbildung 94: Kaplan-Meier-Schätzer für das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zytoplasma

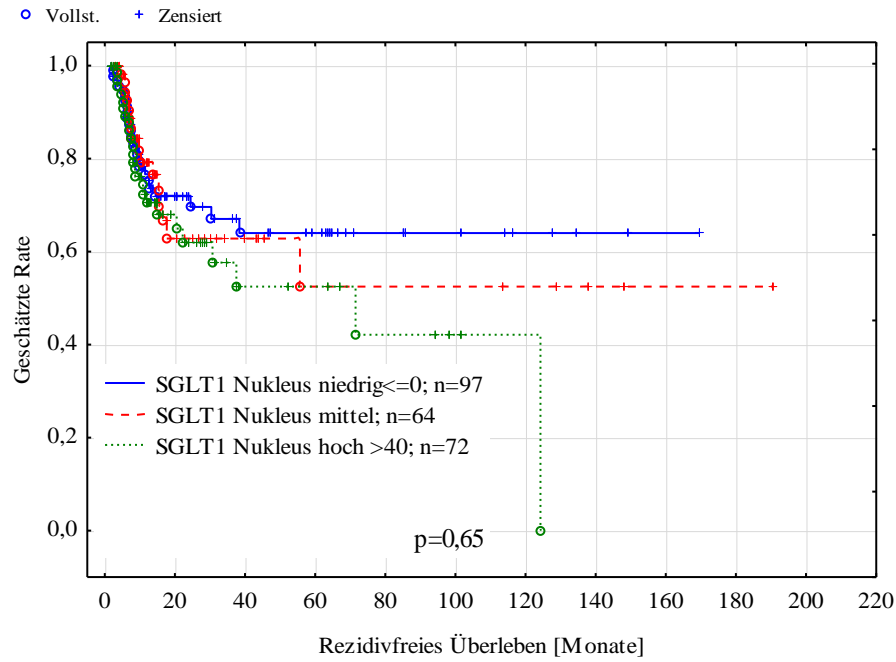


Abbildung 95: Kaplan-Meier-Schätzer für das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zellkern

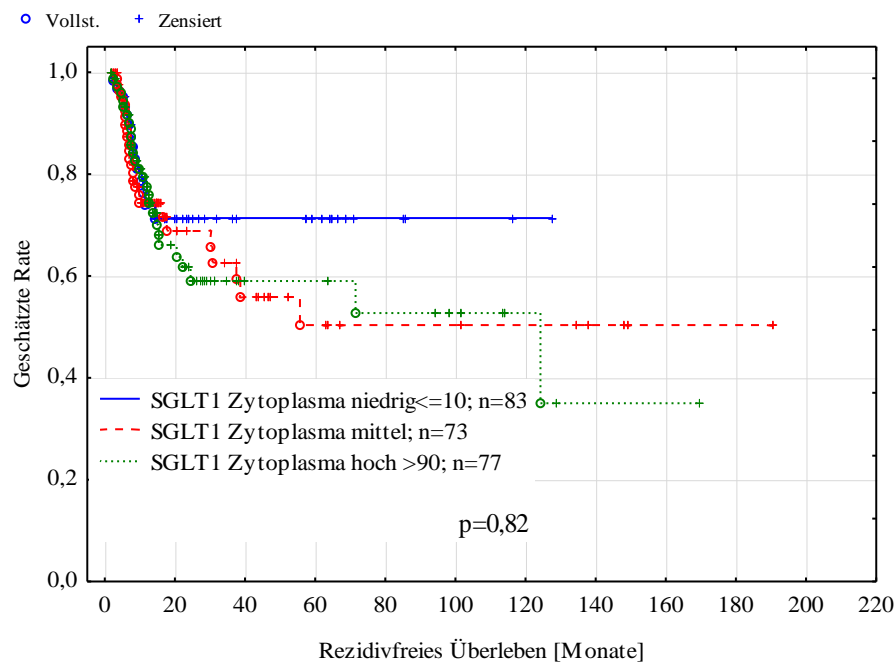


Abbildung 96: Kaplan-Meier-Schätzer für das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zytoplasma

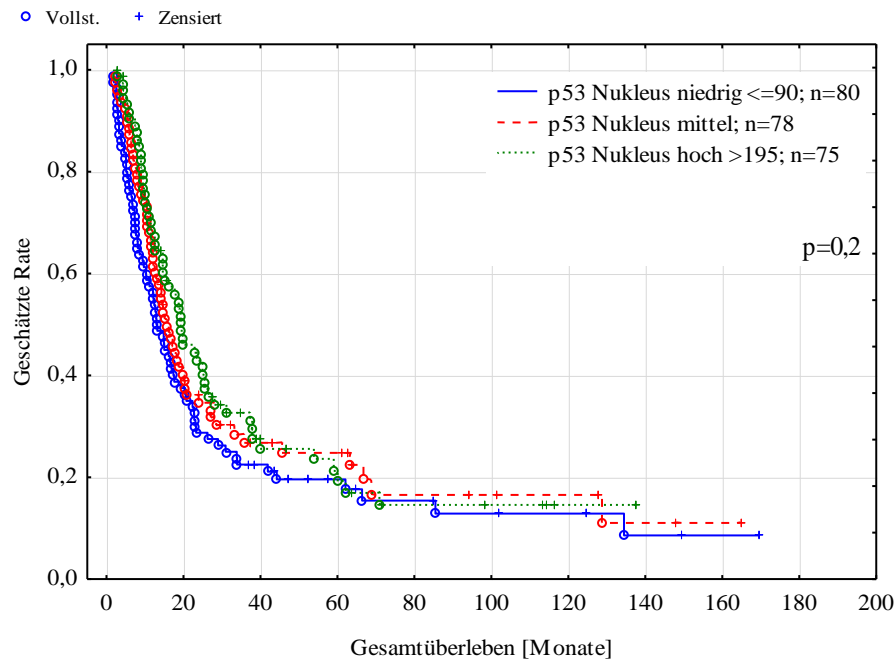


Abbildung 97: Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamtüberleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher p53-Expression im Zellkern

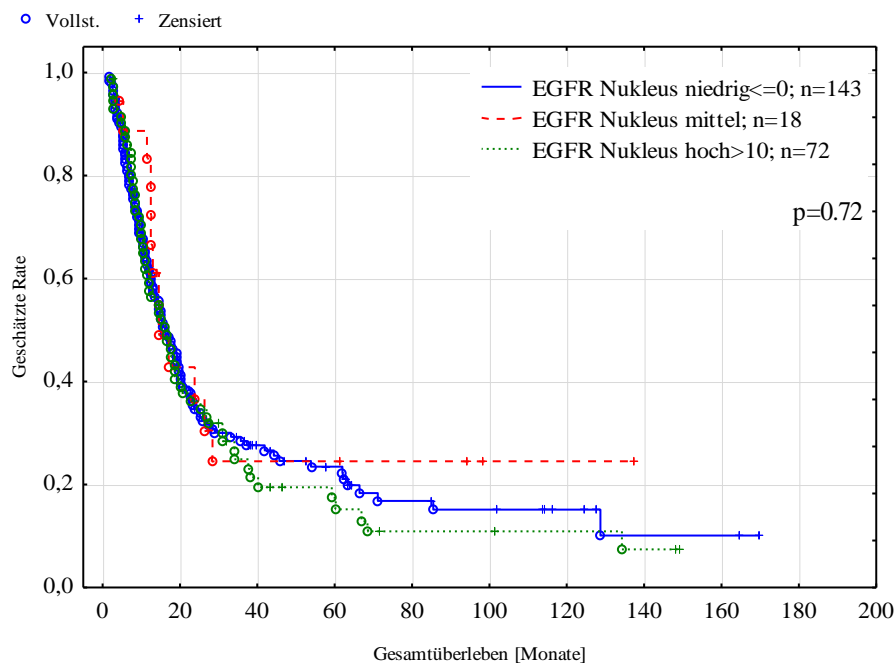


Abbildung 98: Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamtüberleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zellkern

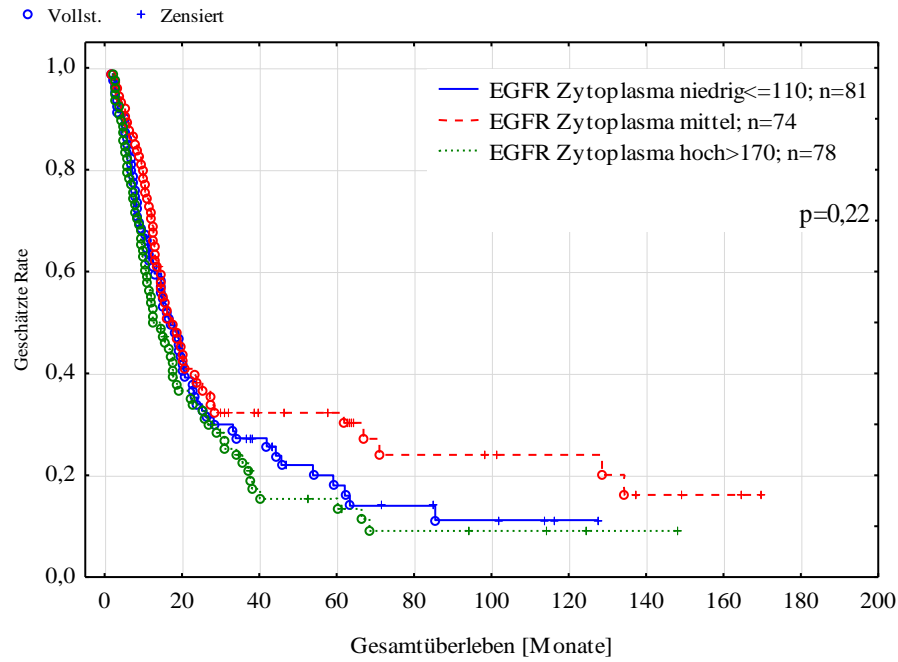


Abbildung 99: Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamtüberleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher EGFR-Expression im Zytoplasma

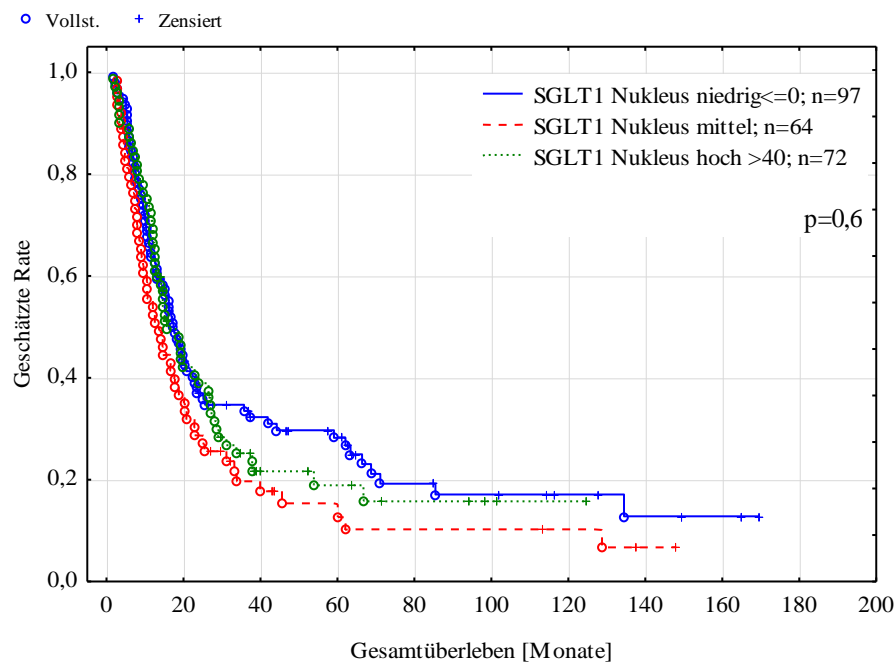


Abbildung 100: Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamtüberleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zellkern

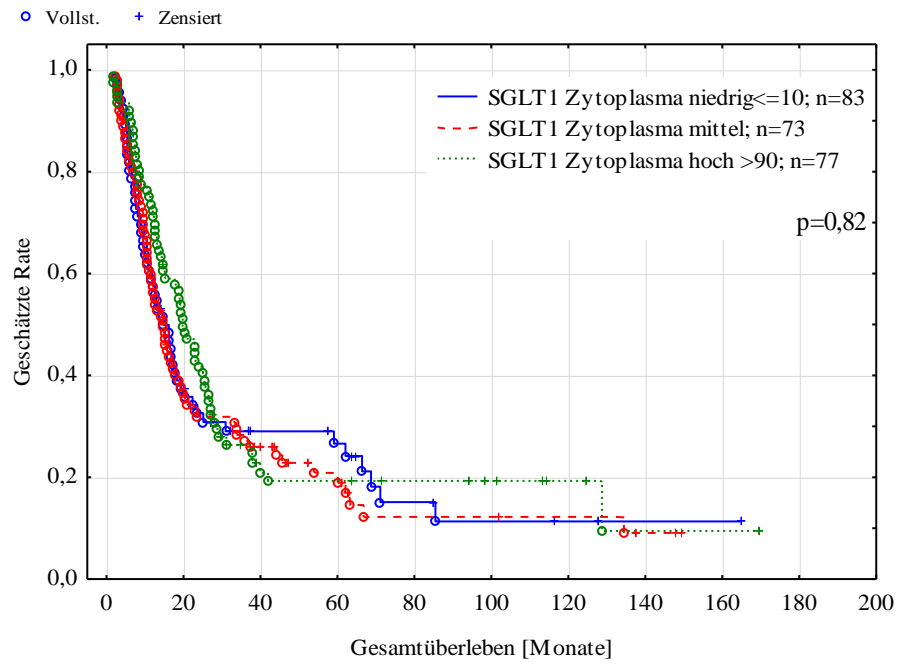


Abbildung 101: Kaplan-Meier-Schätzer für das Gesamtüberleben bei Patienten mit niedriger, mittlerer und hoher SGLT1-Expression im Zytoplasma

