# Diskussion

## Diskussion der Methoden

### Diskussion des Studiendesigns

Für die Erfolgreiche Durchführung von Biomarker-Studien werden ausreichend große Patientenkohorten benötigt, die mit aktuellen Therapiestrategien beahndelt werden. Durch eine multizentrische nationale oder internationale Ausrichtung von Studien können eine höhere Rekrutierungszahl erreicht und die Zeiträume vo Studien verkürzt werden, sodass im Falle der retrospektiv durchgeführten Studien die Therapie der aktuellen Standardtherapie entspricht. Die multizentrisch generierten Studienergebnisse sind dabei besonders robust, weil Einzelzentrumseffekte und anderer Sektionsbias damit reduziert werden.

### Tissue Microarrays

Die TMA ist eine geeignete Methode, um ein großes Gewebekollektiv zeitgleich und unter gleichen Bedingungen untersuchen zu können (Giltnane & Rimm, 2004; Kononen et al., 1998). Es handelt sich um ein kostengünstiges und gewebesparendes Verfahren, das verschiedene biomolekulare Marker am gleichen Gewebekollektiv auf ihre Validität prüft. Die Identifizierung der einzelnen Gewebeproben in einem TMA-Block erfordert höchste Präzision und wird mittels einer Konstruktionsplanung erreicht, die die Lokalisation der einzelnen Fälle im TMA-Block erfasst. Auch die Auswertung der TMA-Präparate muss mit höchster Genauigkeit erfolgen, da jede Stanze die gleiche Form besitzt und es zu Fehlauswertungen kommen kann, z. B. durch Verrutschen des Präparats beim Mikroskopieren. Ein Defizit der TMA-Technik ist, dass nur ein geringer Teil des entnommenen Gewebes untersucht und erfasst wird. Dies könnte z. B. bei heterogenen Tumoren das Ergebnis verfälschen (Nocito et al., 2001). Diese Fehlerquelle kann jedoch durch die Erhöhung der Stanzzahl pro Fall weitgehend minimiert werden. Da die Gewebeproben hinsichtlich Größe und Form vergleichbar sind, wird im Gegensatz zu konventionellen Schnittpräparaten eine subjektive Fehlbewertung durch die Betrachtung von unterschiedlich großen Gewebeproben vermieden.

### Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbemethode ist standardisiertes Verfahren, welches in der histopathologischen Routinediagnostik verwendet wird.(DeLellis et al., 1979). Die Fehlerquote ist gering, da die Färbeautomaten optimal gewartet sind und positive und negative Kontrollpräparate pro Färbereihe mitgeführt werden.90,89 Vielmehr sind die Ergebnisse vom Zustand des Gewebes, dem verwendeten Antikörper und den IHC-Bewertungskriterien abhängig.91 Nachteilig wirkt sich aus, dass das Gewebe durch die Parafineinbettung, die Formalinfixierung und auch durch eine ungeeignete Lagerung der Gewebeblöcke möglicherweise unzureichend erhalten bleibt und somit nicht untersucht werden kann bzw. zu falsch negativen Ergebnissen führt.70,91 Des Weiteren kann die Sensitivität der Antikörperklone von verschiedenen Firmen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen und somit den retrospektiven Vergleich von Studien erschweren.89 Ein weiteres Problem liegt in der Auswertung und dem Vergleich von Färbeergebnissen anderer Studien, da jeder Pathologe subjektiv beurteilt und zum Teil andere Bewertungskriterien verwendet.89,66

Die Detektion der HPV-DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine häufig angewandte Methode, um eine HPV-Infektion zu diagnostizieren, sie ist jedoch nicht standardisiert.22,31 Die verschiedenen PCR- und Hybridisierungsverfahren weisen eine unterschiedliche Sensitivität und Spezifität auf, dies erschwert einen Vergleich der Ergebnisse von einzelnen Studien mit unterschiedlichen Verfahren.22 Durch die hohe Sensitivität der PCR muss bei der Durchführung der HPV-Analyse darauf geachtet werden, dass die Reaktionsgefäße und Pipetten steril sind, um einer möglichen Kontamination und damit falsch positiven Ergebnissen vorzubeugen.92 Als Vorteil dieser Methode gilt, dass sich damit unterschiedliche HPV-Subtypen ermitteln lassen.31 Nachteilig ist, dass eine bestimmte HPV-DNA- Basenlänge in einer Gewebeprobe vorhanden sein muss, um diese amplifizieren zu können.93 Jedoch ist die Qualität der Virus-DNA in den Gewebeproben durch die Vorbehandlung und die Langzeitarchivierung häufig unzureichend und eine Amplifizierung nur bedingt möglich.4,94

## Diskussion der Ergebnisse

### Einfluss von CD44 auf das klinische Outcome von lokal

Wir konnten zeigen, dass eine Überexpression von CD44 in lokal fortgeschrittenen Kopf- Hals-Plattenepithelkarzinomen mit einer schlechten loko-regionären Kontrolle nach postoperativer Radiochemotherapie assoziiert ist. Zudem stellt CD44 neben dem HPV- Status der Tumoren möglicherweise einen weiteren Stratifizierungsparameter zur Individualisierung der postoperativen Radiochemotherapie in Patienten mit Kopf-Hals- Plattenepithelkarzinomen dar.

Zur weiteren Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit sollten die gewonnen Ergebnisse in prospektiven Validierungsstudien unter standardisierten Bedingungen weiter geprüft werden.

Zuvor haben wir und andere gezeigt, dass der HPV-Infektionsstatus ein starker Prognostiker für die lokoregionale Kontrolle bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem HNSCC ist, die eine postoperative Radio(Chemotherapie (6, 28, [**29**](https://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/11/2639#ref-29)) mit einer verbesserten lokoregionalen Kontrolle und Radioempfindlichkeit von HPV16 DNA-positiv im Vergleich zu HPV16 DNA-negativen Tumoren erhielten. In unserer vorherigen multizentrischen Bewertung fanden wir praktisch keine Rezidiven in der HPV16-DNA-positiven Gruppe bei Hochrisiko-HNSCC-Patienten, die PORT-C (6) erhielten. Patienten in dieser sehr vorteilhaften Gruppe können daher Kandidaten für potenzielle Strahlentherapie-Deeskalationsstudien sein. Für die weitere Schichtung von Patienten mit HPV-negativem HNSCC sind jedoch zusätzliche Biomarker erforderlich, um eine lokoregionale Kontrolle vorherzusagen, um zusätzliche Patienten zu identifizieren, die der sehr guten Prognosegruppe zugeordnet werden könnten, und um eine Patientengruppe mit sehr ungünstigem Ergebnis zu definieren, die ein Kandidat für Behandlungsverstärkungsstrategien sein

CD44 ist ein weithin erforschter CSC-Marker in HNSCC ([**30**](https://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/11/2639#ref-30), [**36**](https://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/11/2639#ref-36), [**37**](https://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/11/2639#ref-37)). Eine Studie von de Jong und Kollegen zeigte, dass CD44-und CD44-Proteinspiegel ein lokales Wiederauftreten nach Strahlentherapie bei Patienten mit Kehlkopfkrebs im Frühstadium signifikant vorhersagen ([**38**](https://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/11/2639#ref-38)). Hier haben wir gezeigt, dass Patienten mit chirurgisch resezierten Tumoren ohne nachweisbare CD44-Proteinexpression die lokoregionalen Tumorkontrollraten im Vergleich zu Patienten mit CD44-Proteinexprimierenden Tumoren erhöht haben.

Vor kurzem wurde CD98 experimentell als mutmaßlicher CSC-Marker ([**39**](https://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/11/2639#ref-39)) etabliert. In einer Studie mit 711 Patienten mit oropharyngealem Plattenepithelkarzinom wurde gezeigt, dass HPV-positive Tumore weniger CSC-Marker wie CD44 und CD98 exprimieren, während CD44- und CD98-Positivität mit signifikant geringerem progressionsfreien und OS ([**40**](https://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/11/2639#ref-40)) verbunden war. In unserer Patientenkohorte fanden wir heraus, dass Patienten mit hoher Expression von SLC3A2, das für eines der CD98-Hetodimere kodiert, auch nach PORT-C eine schlechte lokoregionale Tumorkontrolle und ein erhöhtes Risiko für entfernte Metastasen aufweisen.

### HPV-Status als weiteren Stratifizierungsparameter

Während mehrere frühere Studien starke Beweise dafür lieferten, dass der HPV-Status ein signifikanter prognostischer Marker für die lokoregionale Tumorkontrolle und/oder das Überleben bei Patienten ist, die mit primärer Strahlentherapie oder Radiochemotherapie für lokal fortgeschrittenes HNSCC [14], [16], [18], [19] behandelt werden, sind die Auswirkungen des HPV-Status auf das Ergebnis einer postoperativen Radio(Chemotherapie weniger gut untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden multizentrischen retrospektiven Studie des DKTK-ROG zeigen, dass die HPV16-DNA-Positivität ein signifikanter Prognostiker der lokoregionalen Tumorkontrolle und des Überlebens von Patienten ist, die nach einer chirurgischen Resektion von lokal fortgeschrittenem HNSCC mit einer postoperativer Radiochemotherapie auf Die Wirkung scheint in allen Behandlungszentren robust zu sein und wird durch die Ergebnisse von Oropharyngealkrebs angetrieben. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von Snietura et al., die den Einfluss einer HPV-Infektion auf das klinische Ergebnis in einer Post-hoc-Analyse einer randomisierten klinischen Studie mit zwei verschiedenen PORT-Schemas ohne Chemotherapie bei 279 HNSCC-Patienten untersuchte. Die HPV-Analyse wurde bei Tumoren von 131 Patienten durchgeführt. Von den 66 Patienten mit oraler Kavität oder oropharyngealem Karzinom erwiesen sich 9 als positiv für HPV16-DNA und wurden nach 5 Jahren lokal kontrolliert, während die lokoregionale Tumorkontrollrate in der gesamten HPV-DNA-Negativgruppe nur 58 % betrug [24]. Zusammengenommen scheint die HPV16-DNA ein potenziell vielversprechender Biomarker für die Schichtung und individuelle Verschreibung der postoperativen Strahlentherapie zu sein. Die HPV-Positivität scheint ausreichen, um eine Patientenkohorte zu definieren, die nach PORT-C höchst unwahrscheinlich lokoregionale Rezidivenzen entwickelt, was im Gegensatz zur primären Strahlenchemotherapie steht, bei der mehr Schichtungsparameter erforderlich sind [25]. Dieser Unterschied zwischen den beiden Behandlungsansätzen kann dadurch verursacht werden, dass solche zusätzlichen Faktoren, am offensichtlichsten Tumorvolumen, bei der Reseziert des Tumors eine geringere Rolle spielen. Andere patientenbezogene Risikofaktoren wie der Raucherstatus konnten in unserem Datensatz nicht ausgewertet werden, könnten aber auch relevant sein. Wir führen derzeit ähnliche Analysen in einer Patientenkohorte durch, die von denselben Zentren und innerhalb desselben Zeitraums mit der primären Radiochemotherapie behandelt wurde, um solche Differentialprognosen mit einem mehrdimensionalen statistischen Ansatz einschließlich radiobiologischer Schätzungen, z.B. zur Tumorzellzahl, weiter zu bewerten. Für die Gruppe der HPV-negativen Patienten ist die Situation weitgehend anders. Hier kann HPV nicht als einziger Biomarker verwendet werden, um Tumorrezidiven vorherzusagen, wie die geringe Empfindlichkeit von 38 % oder 41 % für HPV16-DNA oder p16-Positivität zeigt. Daher benötigt die HPV-negative Gruppe weitere Untersuchungen potenzieller Biomarker, die für Patienten, die möglicherweise eine Intensivierung der Behandlung benötigen, und für Patienten, für die kein lokales Wiederauftreten zu erwarten ist, schichten.

Derzeit läuft eine prospektive multizentrische Studie des DKTK-ROG, um den prognostischen Wert der HPV16-DNA-Positivität für die lokoregionale Tumorkontrolle nach PORT-C bei 240 HNSCC-Patienten zu validieren. Wenn die Ergebnisse dieser retrospektiven Kohorte bestätigt werden, wird eine interventionelle Studie zur Deeskalation der PORT-C-Strahlungsdosen bei HPV16-DNA-positiven, klinisch geeigneten Oropharyngealkrebspatienten eingeleitet. Die Spezifitätsbewertung der HPV16-DNA-Positivität für die lokoregionale Tumorkontrolle aus dieser Untersuchung legt nahe, dass bei einer moderaten Abnahme der Strahlendosis bei diesen Patienten nur sehr wenige, wenn überhaupt, Wiederauftreten zu erwarten sind, daher können in einer solchen Studie strenge Stoppregeln für die Patientensicherheit gegen das Risiko einer minderwertigen Behandlung angewendet werden, z.B. mit einem Pocock-Grenzansatz [26]. Eine weitere Verfeinerung der Risikoschichtung speziell für die HPV-negative Gruppe kann sich aus einer prospektiven Bewertung klinischer Parameter [27] in der Validierungsstudie und aus den laufenden Bemühungen ergeben, weitere Biomarker in der aktuellen Retrospektive und in der Validierungspatientenkohorte zu identifizieren.

Das geringe Risiko eines lokoregionalen Wiederauftretens bei HPV16-DNA-positiven Oropharyngealkarzinomen nach kurativ beabsichtigter Resektion und PORT-C deutet darauf hin, dass entweder zu Beginn von PORT-C weniger Tumorstammzellen vorhanden sind, dass die verbleibenden HPV-positiven Tumorzellen radio-(chemo-)empfindlicher sind oder eine Kombination aus beidem. Kürzlich wurde berichtet, dass HPV-positive Oropharyngealkrebs eine geringe Expression von Stammzellmarkern wie CD44 und CD98 im Vergleich zu HPV-negativen Oropharyngealkarzinomen zeigt [28]. Darüber hinaus zeigten Patienten mit HPV-positiven und niedrigen CD98-exprimierenden Tumoren ein besseres Gesamtüberleben und ein progressionsfreies Überleben im Vergleich zu Patienten mit hohen CD98-exprimierenden HPV-positiven Tumoren. Die erhöhte Radioempfindlichkeit von HPV-positiven Tumorzellen wird durch eine Reihe von Untersuchungen unterstützt. HPV-positive HNSCC-Zelllinien (alle positiv für HPV-DNA, HPV-RNA und p16), die durch einen Koloniebildungstest in vitro bewertet wurden, zeigten aufgrund der beeinträchtigten DNA-Reparaturkapazität eine höhere zelluläre Radioempfindlichkeit im Vergleich zu HPV-negativen Zelllinien [29]. Ähnliche Beobachtungen wurden von anderen berichtet [30],[31]. Weitere Beobachtungen, die sowohl In-vitro- als auch in In-vivo-Ansätze verwenden, deuten darauf hin, dass überexprimiertes p16 die Rekrutierung von RAD51 an die DNA-Schädensstelle in HPV-positivem HNSCC durch Downregulation von Cyclin D1 beeinträchtigt und damit den Zellzyklus und die homologe rekombinations

Es gibt derzeit keinen allgemein vereinbarten Konsens für die Bewertung des HPV-Infektionsstatus als potenzieller Biomarker; allgemeine Methoden zur Bewertung der HPV-Infektion umfassen HPV-DNA, HPV-RNA und p16-Überexpression [33], [34], [35]. Die überwiegende Mehrheit des HPV-positiven HNSCC hat sich als positiv für HPV16-DNA [21], [36] erwiesen, was den hier berichteten Ergebnissen entspricht. HPV16-DNA zeigte stärkere Korrelationen mit den Ergebnisparametern im Vergleich zur p16-Immunhistochemie in einer Kohorte von 50 Patienten mit oropharyngealen Tumoren, die eine primäre Radiochemotherapie erhielten [37]. Auch in unserer Studie erscheint HPV16 DNA als stärkerer Prognostiker für die lokoregionale Tumorkontrolle im Vergleich zur p16-Expression (Tabelle 4 vs. Ergänzende Tabelle S2), dies muss jedoch in einer größeren Kohorte validiert werden.

In der vorliegenden Studie war HPV16 DNA-Positivität ein starker unabhängiger Prognostiker für die lokoregionale Tumorkontrolle bei Oropharyngeal-, aber nicht bei Mundhöhlentumoren. Im Gegensatz dazu wurde bei Mundhöhlentumoren eine erhöhte p53-Positivität beobachtet, was auf einen alternativen Weg für die Tumorentwicklung hindeutet, z.B. Lebensstilfaktoren. Es ist bekannt, dass das Tumorsuppressorgen TP53 an der Karzinogenese von HNSCC beteiligt ist [38], und seine Überexpression wird bei starken Rauchern und schweren Trinkern berichtet [39], [40]. Erhöhte Positivität wurde mit TP53-Genmutationen in Verbindung gebracht, die zur Stabilisierung und nuklearen Akkumulation von p53-Proteinen führen können[41]. Es wurde gezeigt, dass das HPV-Onkoprotein E6 p53 [42], [43] inaktiviert und hemmt, was der Tatsache entspricht, dass der Großteil unserer HPV-positiven Studienkohorte für p53 negativ war.

In unserer Studie ist die extrakapseuläre Verlängerung der Lymphknoten ein prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben bei Patienten mit oralen Hohlraumkarzinomen, aber nicht in der gesamten Patientenpopulation. Dies scheint im Gegensatz zu den Ergebnissen der Metaanalyse von Bernier et al. zu stehen, die zeigt, dass positive Margen und/oder extrakapseuläre Verlängerung die wichtigsten Prognosen für ein schlechtes Ergebnis/Gesamtüberleben sind [9]. Diese Metaanalyse schichtet jedoch nicht zwischen Mundhöhle und Oropharyngealkrebs, und molekulare Biomarker wurden in den Studien, die in der Metaanalyse enthalten waren, nicht als verwirrende Faktoren untersucht (EORTC- und RTOG-Studien). Darüber hinaus könnten Patienten, die in die EORTC- und RTOG-Studien einbezogen werden, eine andere Population widerspiegeln als die in dieser Studie analysierte Patientenkohorte, was die Notwendigkeit einer konstanten Markeranpassung für die Patientenschichtung unterstreicht. Weitere Bemühungen zur Untersuchung verschiedener Biomarker speziell für die HPV-negative Gruppe, die eine postoperative Radiochemotherapie erhält, sowie für die primäre Radiochemotherapie sind derzeit im DKTK-ROG unter Verwendung von Material der hier berichteten Kohorte und der Validierungsstudie im Gange.

Abschließend zeigen unsere Ergebnisse dieser retrospektiven explorativen multizentrischen Studie, dass die HPV16-DNA nach postoperativer Cisplatin-basierter Radiochemotherapie des lokal fortgeschrittenen Oropharyngealkarzinoms ein starker Prognostiker der lokoregionalen Tumorkontrolle zu sein scheint und daher ein vielversprechender Biomarker für die Patientenschicht Die Wirkung schien über die 8 Behandlungszentren robust zu sein. Bei Patienten mit HPV16 DNA-positivem oropharyngealem Karzinom kann die Deintensifikation eine gültige interventionelle Option für eine derzeit vorbereitete prospektive Studie sein.

Zuvor haben wir und andere gezeigt, dass der HPV-Infektionsstatus ein starker Prognostiker für die lokoregionale Kontrolle bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem HNSCC ist, die eine postoperative Radio(Chemotherapie (6, 28, 29) mit einer verbesserten lokoregionalen Kontrolle und Radioempfindlichkeit von HPV16 DNA-positiv im Vergleich zu HPV In unserer vorherigen multizentrischen Bewertung fanden wir praktisch keine Rezidiven in der HPV16-DNA-positiven Gruppe bei Hochrisiko-HNSCC-Patienten, die PORT-C (6) erhielten. Patienten in dieser sehr vorteilhaften Gruppe können daher Kandidaten für potenzielle Strahlentherapie-Deeskalationsstudien sein. Für die weitere Schichtung von Patienten mit HPV-negativem HNSCC sind jedoch zusätzliche Biomarker erforderlich, um eine lokoregionale Kontrolle vorherzusagen, um zusätzliche Patienten zu identifizieren, die der sehr guten Prognosegruppe zugeordnet werden könnten, und um eine Patientengruppe mit sehr ungünstigem Ergebnis zu definieren, die ein Kandidat für Behandlungsverstärkungsstrategien sein könnte.

Der Sauerstoffversorgungsstatus der Tumore ist einer der bekannten Biomarker für das Ergebnis der primären Strahlentherapie in HNSCC, d.h. von makroskopischen Tumoren, die keiner chirurgischen Entfernung unterzogen wurden. Hier wollten wir die Relevanz des Hypoxiestatus anhand der Hypoxie-Gensignaturen von Toustrup und Kollegen (15) und Eustace und Kollegen (16) in der Tumorprobe bestimmen, die durch chirurgische Resektion vor PORT-C erhalten wurde. Wir fanden heraus, dass der Hypoxiestatus vor der Behandlung bei Patienten mit PORT-C prognostisch war. Patienten mit hohen Hypoxiespiegeln in der vor PORT-C erhaltenen chirurgischen Probe hatten im Vergleich zu Patienten mit niedrigen hypoxischen Tumoren eine schlechte lokoregionale Tumorkontrolle. Dieser Effekt führt hauptsächlich zu der Untergruppe von HPV-negativem HNSCC. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Hypoxie in der chirurgischen Probe untersucht und die Radiochemotherapie nach der Operation auf die potenziellen Resttumorzellen angewendet wurde, ist die Feststellung eines signifikanten Zusammenhangs von Hypoxie innerhalb des resezierten Primärtumors mit dem Ergebnis von PORT-C auf den ersten Blick überraschend. Da es unwahrscheinlich ist, dass sich die geringe Anzahl von Resttumorzellen nach der Operation auch in der Hypoxie unterscheidet, deutet diese Erkenntnis darauf hin, dass Hypoxie das Ergebnis der Strahlentherapie nicht nur durch eine direkte biochemische oder radiobiologische Wirkung auf die zelluläre Radioresistenz des Tumors, sondern auch durch andere radiobiologische Mechanismen beeinflusst. Dies würde mit früheren experimentellen Daten aus unserem Labor übereinstimmen, die zeigen, dass die Hypoxie vor der Behandlung die lokale Tumorkontrolle nach der Strahlentherapie auch dann beeinflusst, wenn die Strahlentherapie unter homogenen anoxischen Bedingungen angewendet wurde (20). Da jüngste Studien darauf hindeuteten, dass Tumorhypoxie auch Stamm- und invasives Wachstum als externen Faktor begünstigt (überprüft in Ref. 30–33), untersuchten wir die Rolle potenzieller CSC-Marker in unserer Kohorte. Es ist bekannt, dass CSCs eine wichtige Rolle bei der Radioresistenz spielen (überprüft in Ref. 34), und eine hochhypoxische Tumormikroumgebung trägt zu einem erhöhten clonogenen Potenzial bei (20, 35).

CD44 ist ein weithin erforschter CSC-Marker in HNSCC (30, 36, 37). Eine Studie von de Jong und Kollegen zeigte, dass CD44- und CD44-Proteinspiegel ein lokales Wiederauftreten nach Strahlentherapie bei Patienten mit Kehlkopfkrebs im Frühstadium signifikant vorhersagen (38). Hier haben wir gezeigt, dass Patienten mit chirurgisch resezierten Tumoren ohne nachweisbare CD44-Proteinexpression die lokoregionalen Tumorkontrollraten im Vergleich zu Patienten mit CD44-Proteinexprimierenden Tumoren erhöht haben.

Vor kurzem wurde CD98 experimentell als mutmaßlicher CSC-Marker (39) etabliert. In einer Studie mit 711 Patienten mit oropharyngealem Plattenepithelkarzinom wurde gezeigt, dass HPV-positive Tumore weniger CSC-Marker wie CD44 und CD98 exprimieren, während CD44- und CD98-Positivität mit signifikant geringerem progressionsfreien und OS (40) verbunden war. In unserer Patientenkohorte fanden wir heraus, dass Patienten mit hoher Expression von SLC3A2, das für eines der CD98-Hetodimere kodiert, auch nach PORT-C eine schlechte lokoregionale Tumorkontrolle und ein erhöhtes Risiko für entfernte Metastasen aufweisen.

Es wurde gezeigt, dass der MET-Weg die Selbsterneuerung und Tumorgenität in stammähnlichen HNSCC-ähnlichen Zellen fördert (41), und es wurde gezeigt, dass die pharmakologische selektive Hemmung der MET zur Elimination von CSCs führt (42). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass MET mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem p16-negativem HNSCC verbunden ist, die mit einer primären Radiochemotherapie behandelt wurden (43). In der aktuellen Studie haben wir gezeigt, dass MET-überexprimierende HPV16-DNA-negative HNSCC mit einer schlechten lokoregionalen Tumorkontrolle und erhöhten entfernten Metastasen nach PORT-C verbunden sind. Interessanterweise zeigten Pennacchietti und Kollegen, dass Hypoxie die Transkription des MET-Protoonkogens aktiviert, dass die MET-Überexpression mit hypoxischen Tumorbereichen verbunden ist und dass die MET-Hemmung ein hypoxiebedingtes Zellwachstum verhindert (44). Unsere Daten, die eine positive Korrelation der MET mit Tumorhypoxie zeigen, unterstützen diesen Zusammenhang beider Faktoren. Dennoch zeigte die relativ geringe Anzahl niedriger hypoxischer Tumoren in der HPV16 DNA-negativ/MET-positiven Gruppe eine signifikant höhere lokoregionale Kontrollrate im Vergleich zu den hochhypoxischen MET-positiven Tumoren. Darüber hinaus deuten unsere Daten darauf hin, dass SLC3A2 und MET bei Patienten mit HPV16 DNA-negativen Tumoren geeignete Marker sein können, um eine Gruppe von Patienten zu bestimmen, die eine sehr schlechte Prognose haben und daher von der Intensivierung der Behandlung profitieren können.

Obwohl die in dieser Studie verwendeten Hypoxieprofile für die lokoregionale Tumorkontrolle prognostisch waren, waren sie kein Hinweis auf ein erhöhtes Risiko entfernter Metastasen (Tabelle 1). Dies erscheint angesichts experimenteller und klinischer Daten, die zeigen, dass Hypoxie entfernte Metastasen antreiben kann (31, 45–47), kontraintuitiv. Nach unserem besten Wissen wurde dies jedoch bisher im HNSCC im postoperativen Umfeld nicht untersucht. Einige der Gene in den Hypoxieprofilen, die in unserer Studie verwendet werden, könnten auch mit anderen biologischen Phänomenen in Verbindung gebracht werden, einschließlich der Stammheit von Krebszellen. Die Korrelationskoeffizienten zwischen den verschiedenen CSC-Markern und Hypoxieprofilen (Tabelle 3) deuten darauf hin, dass, obwohl eine signifikante Korrelation vorliegt, beide Parameter weitgehend unabhängig voneinander ausgedrückt werden. Im Gegensatz zu den Hypoxieprofilen korrelierte die CSC-Markerexpression in unserer Studie nicht nur mit der lokoregionalen Kontrolle, sondern auch mit entfernten Metastasen. Die Expression von CSC-Markern wurde als potenzielles Surrogat der CSC-Dichte vorgeschlagen, d.h. der Anzahl der Zellen, die pro gegebenem Tumorgewebevolumen metastasieren können (30, 34, 36, 46, 48, 49). Weitere mechanistische Untersuchungen des Zusammenhangs von Hypoxie, Stammheit und metastasierendem Risiko in HNSCC in Korrelation mit klinischen Daten scheinen daher ein interessanter Weg für eine bessere Schichtung der Patienten für systemische Therapien und für die Entdeckung neuer Ziele zu sein. Eine wichtige Besonderheit unserer Studie ist, dass Biomarker in einer Kohorte von Patienten untersucht wurden, die postoperativ per Strahlenchemotherapie behandelt wurden, mit insgesamt höheren lokoregionalen Kontrollraten im Vergleich zu Studien zur Bewertung der primären Strahlenchemotherapie bei HPV-negativem oder -positivem HNSCC (50). Derzeit ist nicht bekannt, ob sich das prädiktive Potenzial von Biomarkern für die verschiedenen klinischen Risikogruppen unterscheidet, die eine postoperative oder primäre Radiochemotherapie erhalten. Um diese Frage anzugehen, wird die letztere Risikogruppe von Patienten derzeit mit den gleichen Biomarkern bewertet, die hier vom DKTK-ROG untersucht wurden.

Zusammengenommen ist dies die erste systematische multizentrische Analyse, die einen Zusammenhang zwischen hohen Konzentrationen von Tumorhypoxie und CSC-Markerexpression innerhalb des chirurgisch entfernten Primärtumors mit beeinträchtigter lokoregionaler Tumorkontrolle nach PORT-C in HNSCC zeigt. In HPV16 DNA-negativem HNSCC kann die Negativität für diese Parameter helfen, eine Untergruppe von Patienten mit lokoregionalen Kontrollraten zu identifizieren, die so hoch sind wie bei HPV16 DNA-positiven Tumoren beobachtet. Darüber hinaus scheinen Hypoxie- und CSC-Marker-positive Tumoren eine Untergruppe von Patienten darzustellen, die mit dem aktuellen Standard-PORT-C unterbehandelt ist. Nach der Validierung in einer derzeit laufenden prospektiven Studie können diese Parameter dazu beitragen, Patienten für individualisierte Behandlungsdeeskalations- oder Intensivierungsstrategien weiter zu schichten.

# 