

Medizinische Fakultät der Universität Halle-Wittenberg

Evaluierung von Proteinen der Glykolyse zur Prognosekalkulation beim Mundhöhlenkarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

Von Tobias Berg

Geboren am 02.10.1979 in Köln

Betreuer: apl. Prof. Dr. Dr. Alexander Eckert

Gutachter:

1. apl. Prof. Dr. Dr. A Eckert, Halle (Saale)
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Kolk, Innsbruck
3. apl. Prof. Dr. S. Knipping, Dessau

14.01.2020

04.12.2020

**Meinem Großvater Gerd Berg
(19.12.1927-14.03.2016)**

Referat

Orale (OSCC) und oropharyngeale (OPSCC) Plattenepithelkarzinome stellen unter den Tumoren der Kopf-Hals-Region den größten Anteil dar. Die Prognose des oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinoms hat sich in vergangenen Jahrzehnten nicht wesentlich verbessert und so liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate unverändert bei ca. 40 bis 50%.

Es hat sich zudem gezeigt, dass die Stadieneinteilung über die TNM-Klassifikation zur Prognoseabschätzung unzureichend ist. Daher besteht schon seit langer Zeit die Bestrebung, zusätzliche molekulare Marker zur Prognoseabschätzung zu identifizieren, welche bezüglich der Therapieentscheidung und Nachsorge als Entscheidungshilfe dienen können. Zudem erhofft man sich durch das Aufdecken der molekularen Mechanismen neue Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Therapie.

Bereits seit einiger Zeit stehen die metabolischen Prozesse der Tumorzelle im Fokus der wissenschaftlichen Betrachtung. Dabei hat die 1952 von Otto Warburg beschriebene Tatsache der aeroben Glykolyse (Warburg-Effekt) eine Renaissance erfahren und so beschäftigen sich zahlreiche Arbeiten mit der Regulation der Glykolyse und ihren Auswirkungen auf die Tumorzelle.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hexokinase 2 (HK2) und Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) zwei wichtige Enzyme der Glykolyse untersucht. Dabei wurde die immunhistochemische Expression dieser Enzyme an Paraffinschnitten von 116 Patienten mit oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen betrachtet. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate betrug 40% und war signifikant abhängig vom Tumorstadium und vom Lymphknotenstatus. Die Expression der Enzyme war unabhängig von Tumorstadium, Ausmaß möglicher Lymphknotenmetastasen, Geschlecht und Alter der Patienten.

Bei hoher Gesamtexpression von Hexokinase 2 konnte ein statistisch signifikantes 1,8fach erhöhtes Sterberisiko gezeigt werden, bei hoher Expression an der Invasionsfront des Tumors zeigte sich sogar ein ebenfalls signifikantes 2,4fach erhöhtes Sterberisiko ($p=0,012$).

Eine hohe Expression von PFKFB3 des gesamten Tumors oder im Bereich der Invasionsfront war nur in der univariaten Analyse mit einem statistisch signifikanten 1,6fach erhöhtem Sterberisiko verbunden und konnte nicht als unabhängiger prognostischer Parameter bestätigt werden.

Die Bestimmung der Expression von Hexokinase 2 als unabhängiger additiver prognostischer Marker könnte somit eine einfache und kostengünstige Methode für eine prognostische Kalulation bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle darstellen, welche die bisher gesicherten klinischen und pathologischen Parameter sinnvoll ergänzen könnte.

Inhalt

1.	Einleitung.....	1
1.1	Das Plattenepithelkarzinom von Mundhöhle (OSCC) und Oropharynx (OPSCC)	1
1.2	Molekulare Mechanismen der Karzinogenese oraler und oropharyngealer Plattenepithelkarzinome	3
1.3	Tumorhypoxie, HIF1 α und Glukosemetabolismus	6
2.	Zielstellung der Arbeit	14
3.	Material und Methoden	15
3.1	Material	15
3.1.1	Patientenkollektiv.....	15
3.1.2	Histologische Untersuchung.....	15
3.1.3	Graduierung.....	16
3.1.4	TNM-Klassifikation.....	16
3.1.5	Antikörper und Zielantigene.....	18
3.2	Methoden.....	19
3.2.1	Anfertigung von Paraffinschnitten	19
3.2.2	Immunhistochemische Untersuchungen	19
3.2.3	Mikroskopische Auswertung	20
3.2.4	Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner	21
3.2.5	Statistische Auswertung	21
4.	Ergebnisse.....	23
4.1	Alters- und Geschlechtsverteilung, Überleben	23
4.2	Tumorklassifikation und Graduierung.....	23
4.3	Überlebensraten in Abhängigkeit von TNM-Stadium, Graduierung und Patientenalter.....	26
4.4	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen für HK2	29
4.5	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen für PFBKFB3.....	33

5.	Diskussion.....	42
5.1	Patientenkollektiv und Überleben	42
5.2	Hexokinase 2-Expression in OSCC und OPSCC	44
5.3	PFKFB3-Expression in OSCC und OPSCC.....	46
5.4	HIF1 und sein Einfluss auf den Metabolismus der Tumorzelle	48
6.	Zusammenfassung und Ausblick	51
7.	Literatur.....	54
8.	Tabellenanhang	65
9.	Thesen	69

Abkürzungen

AML	Akute myeloische Leukämie
ASCT2	ASCT-type-2 Aminosäuretransporter 2
ATP	Adenosintriphosphat
CA IX	Carboanhydrase IX
CCDN1	Cyclin D1 kodierendes Gen
CDK	Cyclin-dependent kinases
CoA	Coenzym A
COX	Cytochrom-c-Oxidase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFRvIII	EGFR Variante III
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
GLUT1	Glukosetransporter 1
GLUT3	Glukosetransporter 3
HIF1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HK2	Hexokinase 2
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humanes Papilloma Virus
HR	Hazard Ratio
HR-HPV	High Risk HPV
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IRS	Immunreaktiver Score, Immunreaktiver Score
JAK	Januskinase
LAT1	Large Type Aminosäuretrasnporter 1
LDHA	Lactatdehydrogenase A
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	MAP-Kinase
MCT4	Monocarboxylate transporter 4
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MXI1	MAX-interacting protein 1
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid

NADPH	<i>Nicotinamidadeninukleotidphosphat</i>
OPSCC	<i>Oropharyngeales Plattenepithelkarzinom</i>
OSCC	<i>Orales Plattenepithelkarzinom</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PDK1	<i>Pyruvatdehydrogenasekinase 1</i>
PFK1	<i>Phosphofruktokinase 1</i>
PFKFB3	<i>Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-bisphosphatase</i>
PI3K	<i>Phosphoinositid-3-Kinasen</i>
pRB	<i>Retinoblastom-Protein</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RAF	<i>RAT Fibrosarcoma Protoonkogen</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma Protoonkogen</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TPI	<i>Triosephosphatisomerase</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
VHL	<i>Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgen</i>

1. Einleitung

1.1 Das Plattenepithelkarzinom von Mundhöhle (OSCC) und Oropharynx (OPSCC)

Unter den Tumoren der Kopf- und Halsregion sind die Plattenepithelkarzinome (HNSCC) mit 90% die häufigste Krebsentität. Plattenepithelkarzinome von Mundhöhle und Oropharynx stellen hierbei die größte Subgruppe dar (Bose et al. 2013). Das orale Plattenepithelkarzinom (OSCC) umfasst Tumoren der Zunge (ICD-10: C01 und C02), des unteren und oberen Alveolarfortsatzes (ICD-10: C03), des Mundbodens (ICD-10: C04), des harten Gaumens (ICD-10: C05) sowie jene von Wangenschleimhaut, Retromolarregion und Sulcus buccomandibularis bzw. Sulcus maxillaris (ICD-10: C06). Zu den Karzinomen des Oropharynx (OPSCC) zählen die der Vorderwand mit Zungengrund (ICD-10: C01) und Vallecula (ICD-10: C10.0), der Seitenwand (ICD-10: C10.2) inklusive Tonsillen (ICD-10: C09.2), Fossa tonsillaris (ICD-10: C09.0), Gaumenbögen (ICD-10: C09.1) und Glossotonsillarfurche (ICD-10: C09.1), der Hinterwand (ICD-10: C10.3) und oberen Wand mit oraler Oberfläche des weichen Gaumens (ICD-10: C05.1) und Uvula (ICD-10: C05.2) (Wittekind und Meyer 2013). Nach ICD werden auch die Tumoren der Lippe (ICD-10: C00) zu den OSCC gezählt, was klinisch-pathologisch aufgrund der Unterschiede der Epithelien und teilweise auch der Risikofaktoren jedoch problematisch ist (Zancope et al. 2010; Batista et al. 2010). In den Daten des Robert-Koch-Instituts sind die Karzinome der Lippe jedoch enthalten.

Für das Jahr 2015 wurden die bundesweiten Neuerkrankungen an Tumoren von Mundhöhle und Rachen mit 9130 Männern und 3700 Frauen in Deutschland angegeben, was einer standardisierten Erkrankungsrate von 16,9 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern bei Männern und 5,9 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern bei Frauen entspricht. Den Hauptanteil dieser Krebserkrankungen macht mit 90% das Plattenepithelkarzinom aus. Tumoren der Mundhöhle und des Rachens belegen somit bei Männern den neunten und bei Frauen den fünfzehnten Platz bei den Krebsneuerkrankungen, bei den Krebssterbefällen belegen sie bei den Männern ebenfalls den neunten und bei den Frauen den siebzehnten Platz. Die standardisierte Sterberate (SDR) betrug bei Männern 7,3 und bei Frauen 1,9 je 100.000 Einwohner (Robert Koch-Institut 2017). Der Unterschied zwischen den Geschlechtern wird vor allem auf die Unterschiede im Alkohol und Tabakkonsum zurückgeführt (Blot et al. 1988).

In den vergangenen Jahrzehnten haben sich die Überlebensraten für Karzinome der Mundhöhle und des Oropharynx nicht wesentlich verbessert (Warnakulasuriya 2009; Shiboski et al. 2000; Listl et al. 2013). Für Tumore, die im Zeitraum zwischen 1997 und 2006 in Deutschland diagnostiziert wurden, fand sich eine altersstandardisierte Fünf-Jahres-Überlebensrate von 54,6%. Dabei haben Frauen mit 61,3% im Vergleich zu Männern mit 53,0% eine günstigere Fünf-Jahres-Überlebensrate. Das Überleben

verschlechtert sich mit steigendem Alter zunehmend, wobei Männer jedoch ab dem 74. Lebensjahr eine etwas günstigere Überlebensrate aufweisen. Diese ist möglicherweise auf Selektionseffekte durch ein frühzeitiges Versterben an Ko-Morbiditäten, die auf Rauchen zurückzuführen sind, bedingt (Listl et al. 2013). Vergleichsweise günstig ist die Prognose bei Tumoren der Lippe, möglicherweise weil über eine frühe Detektion der Veränderungen eine gute Operabilität gewährleistet ist (Molnár et al. 1974; Cerezo et al. 1993). Aufgrund der bereits erwähnten Unterschiede sollten diese nicht im engeren Sinne zu den OSCC gezählt werden und als eigene Entität betrachtet werden. Übereinstimmende Daten aus Europa und den USA weisen für Mundbodenkarzinome mit in Deutschland 49,3% und in den USA 53,2% eine besonders schlechte Fünf-Jahres-Überlebensrate auf (Howlader et al. April 2017).

In frühen Stadien können OSCC und OPSCC mittels Operation oder Bestrahlung behandelt werden (National Comprehensive Cancer Network 2017). Dabei konnte in prospektiven randomisierten kontrollierten Multicenterstudien bisher keine Überlegenheit der chirurgischen gegenüber der Strahlentherapie festgestellt werden (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF) 2012).

Bei fortgeschrittenen Karzinomen kommt ein multidisziplinärer Ansatz mit chirurgischer Therapie inklusive Entfernung der Halslymphknoten, Strahlentherapie und Chemotherapie zur Anwendung wobei auch der monoklonale Antikörper Cetuximab, der gegen den EGF-Rezeptor gerichtet ist, eine Rolle spielt (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF) 2012; Lo Nigro et al. 2017; Levendag et al. 1996; Rodgers et al. 1993).

Zu den gesicherten Risikofaktoren oraler und oropharyngealer Plattenepithelkarzinome zählen Tabakrauch und Alkohol (Blot et al. 1988). So haben Raucher ein 10fach erhöhtes Risiko an einem Plattenepithelkarzinom von Mundhöhle oder Oropharynx zu erkranken als Personen, die nie geraucht haben (Sturgis und Cinciripini 2007). Andere Formen des Tabakkonsums spielen vor allem in Asien eine Rolle wo der orale Konsum von Tabakprodukten und Betelnüssen eine nicht unbedeutende Rolle spielt und daher die Inzidenzraten des Plattenepithelkarzinoms teilweise deutlich höher liegen (Cardesa et al. 2009; Gupta und Johnson 2014). Der unabhängige Effekt von Alkohol als Risikofaktor für die Entwicklung OSCC und OPSCC wurde in zahlreichen Studien bestätigt (Goldstein et al. 2010). In einer Metaanalyse ergab sich so für einen Alkoholkonsum von Nichtrauchern ein relatives Risiko von 8,61 an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken (Tramacere et al. 2010). Eine Kombination von Rauchen und Alkoholkonsum hat hyperadditive Auswirkungen auf das Erkrankungsrisiko, in einer Metaanalyse wurden relative Risiken von 6,93 vs. 2,56 beschrieben (Ansary-Moghaddam et al. 2009).

Ein weiterer Risikofaktor ist die Infektion mit dem humanen Papilloma-Virus (HPV), im Speziellen dem Hochrisiko-HPV-Typen 16, der für über 90% aller HPV-assoziierten Karzinome im Kopf-Hals-Bereich verantwortlich ist (Bose et al. 2013; Mollenhauer et al. 2014; Sethi et al. 2012). Dabei scheinen jedoch

Karzinome des Oropharynx, besonders jene am Zungengrund und den Tonsillae palatinae, eine hohe Prävalenz (50%) für eine Infektion mit HR-HPV zu haben. Diese Besonderheit wird durch die erhöhte Suszeptibilität des hier vorhandenen lymphoepithelialen retikulierten Kryptenepithels erklärt (Ansary-Moghaddam et al. 2009; Sethi et al. 2012). Vermutlich ist darauf auch die steigende Inzidenz an diesen beiden Lokalisationen zurückzuführen. (Hammarstedt et al. 2006; Attner et al. 2010). Obwohl bereits sehr kleine und häufig klinisch okkulte Tumoren eine ausgeprägte Tendenz zur lymphonodalen Metastasierung aufweisen, zeigen die HPV-assoziierten Oropharynxkarzinome verglichen mit HPV-negativen Karzinomen eine günstigere Prognose mit einem besseren Ansprechen auf Strahlen- und Chemotherapie (Mollenhauer et al. 2014; Zengel et al. 2012). Dabei wird neben der fehlenden Feldkanzerisierung mit einer geringeren Rate an multifokalen Tumoren auch eine geringere genetische Instabilität der HPV-assoziierten Karzinome als mögliche Ursache diskutiert (Mollenhauer et al. 2014; Zengel et al. 2012; Klusmann et al. 2009). Für Karzinome der Mundhöhle ist dieser Zusammenhang nicht klar und die immunhistochemische Überexpression von p16 wird hier nicht als ausreichender Surrogatparameter für eine Infektion mit HR-HPV gesehen (Bussu et al. 2013). Immunhistochemisch wird hier nur bei ca. 5% der Fälle eine Färbereaktion gefunden, von denen dann nur bei 2% auch mittels PCR HPV nachweisbar ist (Götz et al. 2016).

1.2 Molekulare Mechanismen der Karzinogenese oraler und oropharyngealer Plattenepithelkarzinome

In den vergangenen Jahrzehnten sind wichtige Erkenntnisse über die grundlegende Tumorbilologie und ihre Signalkaskaden gemacht worden (Bose et al. 2013). Von Interesse ist dabei die Identifizierung therapeutisch beeinflussbarer Ziele, sogenannter „drugable targets“ (Nowak et al. 2012). Es handelt sich hierbei um Moleküle der Karzinomzelle, gegen die selektive Wirkstoffe eingesetzt werden um tumorspezifische Signalwege zu beeinflussen. Bei den Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region erfolgte die Erforschung dieser Mechanismen vergleichsweise spät (Bose et al. 2013).

Von den zahlreichen möglichen Signalkaskadewegen sollen nachfolgend einige wenige näher charakterisiert werden.

Der EGFR-Signalweg

EGFR gilt als etabliertes Onkogen von oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen und gehört zu den transmembranären Tyrosinkinase. Über Liganden wie EGF, TGF oder beta-Cellulin dimerisieren EGFR Monomere und aktivieren so die Tyrosinkinase welche über nachgeschaltete Transduktionskaskaden mittels RAS, RAF, MEK und ERK die Proliferation und das Überleben der Zelle

regulieren (Bose et al. 2013). Darüber hinaus fungiert EGFR als Transkriptionsfaktor für Gene wie *CCDN1* welches Cyclin-D1 kodiert und als Kofaktor anderer Transkriptionsfaktoren wie STAT (Bose et al. 2013; Lin et al. 2001). Für die Tumorbiologie bedeutet die gesteigerte EGFR-Aktivität eine erhöhte Proliferation und ein längeres Überleben der Zelle. Zudem spielt sie eine wichtige Rolle bei Metastasierung und Strahlenresistenz (Bose et al. 2013). Trotz des übereinstimmenden Nachweises von Mutationen und Amplifikationen von EGFR ist die prognostische Aussagekraft dieser Marker widersprüchlich, es wird sowohl über eine Assoziation einer Überexpression von EGFR mit einem schlechteren outcome als auch von einem fehlenden Zusammenhang mit dem outcome berichtet. Möglicherweise hängt dies mit der Heterogenität der von EGFR aktivierten Signalkaskaden zusammen. (Bose et al. 2013; Leemans et al. 2011).

Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg

Die Aktivierung dieses Signalweges ist ein häufiges Ereignis in der Onkogenese unterschiedlicher Tumorentitäten (Vivanco und Sawyers 2002). Über Rezeptortyrosinkinasen wird PI3K aktiviert und führt zur Bildung von PI3K welches AKT/Proteinkinase B in die Plasmamembran rekrutiert und über eine Phosphorylierung durch PDK1 und mTOR-Komplex 2 aktiviert. Über mTOR Komplex 2 werden dadurch in der Zelle anabole Prozesse wie die Synthese von Ribosomen und Proteinen wie eIF4B, eIF4E und eIF4G initiiert, welche eine wichtige Rolle beim Tumorwachstum spielen, indem sie anti-apoptotisch in den Zellzyklus eingreifen (Hay und Sonenberg 2004). Der Signalweg kann entweder über eine aktivierende Mutation von *PIK3CA* oder den Verlust des Tumorsuppressorgens *PTEN* aktiviert werden (Bose et al. 2013). Beides wurde für OSCC und OPSC beschrieben (Murugan et al. 2008; Stransky et al. 2011).

Der JAK-STAT-Signalweg

Zytokine binden an Membranrezeptoren, welche ihrerseits Tyrosinkinasen, die Janus Kinasen (JAKs) binden. Darüber werden STAT Proteine phosphoryliert, die Dimere bilden und in den Zellkern transloziert werden, wo sie als Transkriptionsfaktoren fungieren (Bose et al. 2013). Auch sie können darüber hinaus den RAS-MAPK- und den PI3K-AKT-Signalweg aktivieren (Yu et al. 1995). Die Proteine *STAT3* und *STAT5* werden in Karzinomen der Kopf-Hals-Region exprimiert und aktiviert (Lai und Johnson 2010). *STAT3*, welches bereits sehr früh in der Tumorgenese tabakassoziiertes Plattenepithelkarzinome und vor allem in T1- und T2-Tumoren überexprimiert wird, führt über eine Erhöhung von RAS zu einer Aktivierung der EGFR-Signalkaskade (Nagpal et al. 2002; Arredondo et al. 2005). Die Aktivierung von *STAT5* führt zu Tumorwachstum und trägt durch epithelial-mesenchymale

Transition zur Karzinogenese bei. Zudem scheint die konstitutive Aktivierung von STAT5 in HNSCC zu verminderter Suszeptibilität einer EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor vermittelten Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion zu führen (Koppikar et al. 2008)

HPV-induzierte Kanzerogenese

Die DNA des HPV-Genoms kodiert unter anderem für die Proteine E5, E6 und E7, welche mit der viralen Onkogenese des Plattenepithelkarzinoms assoziiert sind. Die Ubiquitin-Ligase E6 markiert dabei das Tumorsuppressorgen p53, welches dadurch dem Abbau durch Proteasomen zugänglich gemacht wird, wodurch die p53-abhängige Regulation von Zellzyklus und Apoptose gestört wird (Bose et al. 2013; Nguyen et al. 2010). Das E7 Onkoprotein aktiviert CDK und hemmt die CDK-Inhibitoren p21 und p27, wodurch die Proliferation induziert wird. Außerdem bindet und inhibiert es das Tumorsuppressorgen pRB (Bose et al. 2013; Scheffner et al. 1990). Durch das Onkoprotein E5 wird die Expression von EGFR an der Zelloberfläche erhöht und so über den EGFR-Signalweg die Zellproliferation induziert (DiMaio und Petti 2013).

MicroRNAs beim HNSCC

Bei MicroRNAs (miRNAs) handelt es sich um hochkonservierte nicht-kodierende RNAs, welche eine wichtige Rolle bei der Regulation der posttranskriptionalen Genexpression spielen. Dabei bindet einer der Stränge der durch RNA-Polymerase II transkribierten und durch RNaseIII und RNase Dicer prozessierten doppelsträngigen miRNA an den RNA-induzierten-Silencer-Komplex (RISC) (Bose et al. 2013). Der so entstandene miRISC Komplex kann nun einerseits die mRNA des Zielgens degradieren und andererseits die Translation regulieren (Kim und Nam 2006). Die miRNA-Signatur ist sehr gewebespezifisch und die Überexpression onkogener miRNA wurde in verschiedenen Malignomen mit Tumorgenese, Proliferation und Metastasierungspotential in Verbindung gebracht (Bose et al. 2013). Bei HNSCC wurde eine reduzierte Expression von miR-153, miR-200c, miR-363, miR-203, miR-17, miR-205, miR-Let-7d, Let-7g, miR-34a, miR-126a, miR-375, miR-491-p5, miR 218, miR-451 und miR-125b als adverser prognostischer Faktor beschrieben (Jamali et al. 2015; Childs et al. 2009; Wong et al. 2008). Dabei reguliert Let7 KRAS und miR-133a/b hat über die Regulierung der PKM2 direkte Wirkung auf den Metabolismus der Tumorzelle (Bose et al. 2013).

Die Überexpression von miR-21, miR-18a, miR-134a, miR-210, miR-181a, miR-19a, und miR-155 ist mit einem schlechteren Überleben der Patienten assoziiert (Jamali et al. 2015). Auch für miR-106b-25-Cluster, miRNA-17-92 und miR-106a, welche über die Regulation von p21/CDK1A vermittelt wird ist eine Überexpression in HNSCC beschrieben (Bose et al. 2013).

Neben einem Nutzen als Biomarker zur Therapieüberwachung stellen miRNA ein vielversprechendes Ziel zur zielgerichteten molekularen Therapie dar (Greither et al. 2017; Bose et al. 2013).

Tumorhypoxie-assoziiertes Signalweg, HIF1

Einer der am detailliertesten untersuchten Mechanismen in der Karzinogenese ist der Hypoxie-assoziierte Signalweg. Alle menschlichen Zellen benötigen für den Ablauf metabolischer Prozesse ausreichende Konzentrationen an Sauerstoff. In Komplex IV der Atmungskette wird Sauerstoff als Elektronenakzeptor benötigt (Wang und Semenza 1995). In allen soliden Tumoren besteht aufgrund einer unzureichenden Vaskularisation oder einer eingeschränkten Diffusionsstrecke eine deutliche Hypoxie (Denko 2008; Eckert et al. 2012). Um sich an die Verhältnisse dieses Tumormikromilieus anzupassen, nutzt die Zelle Mechanismen, die durch den Transkriptionsfaktor HIF1 α reguliert werden (Denko 2008; Semenza 2008). Ziel ist hierbei den Metabolismus an den hohen Energiebedarf des Tumors zu adjustieren und den Zellstoffwechsel hinsichtlich des geringeren Sauerstoffangebots so zu verändern, dass der Zelltod verhindert wird. Dieses wird über eine Regulation metabolischer Enzyme und eine Anpassung der Mitochondrienfunktion erreicht (Denko 2008). Die Expression Hypoxie-assoziiertes Proteine im OSCC und OPSCC und ihre prognostische Relevanz sind seit einiger Zeit von großem Interesse (Eckert et al. 2012). Ein wichtiger Target-Stoffwechselweg des HIF1 α -vermittelten pathways ist die Glykolyse. Im Kern der vorliegenden Arbeit wurden Enzyme des Glukosestoffwechsels untersucht, so dass eine genauere Darstellung der beteiligten Prozesse folgt.

1.3 Tumorhypoxie, HIF1 α und Glukosemetabolismus

Im Folgenden sollen die Mechanismen des tumorhypoxie-assoziierten Signalwegs und der Glukosemetabolismus der Tumorzelle genauer beschrieben werden:

Der Warburg Effekt und der Metabolismus der Tumorzelle unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Bereits in den 1920er Jahren beschrieb Otto Warburg, dass Tumorzellen unter aeroben Bedingungen einen im Vergleich zum Normalgewebe bis zu 10fach erhöhten Glukoseumsatz mit entsprechender Laktatproduktion haben und zwar auch dann, wenn eigentlich genug Sauerstoff zur oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien vorhanden wäre. Er nahm daher an, dass die relative Zunahme der Glykolyse in Tumorzellen unter aeroben Bedingungen der Beweis für eine Störung der Atmungskette sei (WARBURG 1956). Mittlerweile ist klar geworden, dass es sich um eine Störung der

Glykolyse-Regulation handelt, wobei jedoch eine Störung der Mitochondrienfunktion eine wichtige Rolle spielt (Ansary-Moghaddam et al. 2009; Vander Heiden et al. 2009; Koppenol et al. 2011).

Während eine normale Zelle also unter aeroben Bedingungen Pyruvat in den Zitratzyklus einschleust, über die oxidative Phosphorylierung ATP generiert und nur unter anaeroben Bedingungen Pyruvat zu Laktat reduziert, greift die Tumorzelle unter an- und aeroben Bedingungen auf diesen Mechanismus zurück. In der Zeit, in der eine normale Zelle 36 Moleküle ATP aus einem Molekül Glucose produziert, produziert eine Tumorzelle somit unter aeroben Bedingungen 56 Moleküle ATP aus 11 Molekülen Glucose, unter anaeroben Bedingungen 2 Moleküle ATP aus 1 Molekül Glucose (Koppenol et al. 2011). Dieser Mechanismus entspricht einer evolutionären Konservierung der alkoholischen Gärung einzelliger Organismen (Vander Heiden et al. 2009). Die geringere Effektivität der ATP-Produktion durch den Warburg-Effekt spielt im Tumorgewebe, in dem ein hoher Fluss durch die Glykolyse herrscht keine relevante Rolle (DeBerardinis et al. 2008). Zudem bietet er den Vorteil, dass Intermediärprodukte des Glukosestoffwechsels zur Synthese essentieller Bausteine des Zellwachstums zu Verfügung stehen (DeBerardinis et al. 2008; Vander Heiden et al. 2009). Aus der Zellkultur ist bekannt, dass die einzigen zwei Moleküle, welche in relevanter Weise verstoffwechselt werden, Glukose und Glutamin sind. Dieses verdeutlicht, dass in Tumorzellen ein vollständiger Abbau der Glukose via oxidativer Phosphorylierung der Notwendigkeit einer Generierung von Biomasse entgegenläuft. Es muss daher ein Teil der Zwischenprodukte der Glykolyse zur Generierung anderer Bausteine der Zelle verwendet werden (z.B. Acetyl-CoA für Fettsäuren, Intermediärprodukte der Glykolyse für Aminosäuren oder Ribose für Nukleotide) (Vander Heiden et al. 2009). Zudem ist die Glykolyse allein nicht ausreichend für einen Metabolismus der für die besonderen Bedürfnisse der Tumorzelle hinsichtlich Proliferation und Zellteilung ausreichend ist (Dang et al. 2011; Dang 2010a). Daher besteht eine enge Verbindung zur Glutaminolyse. Glutamin ist die Aminosäure mit der höchsten Konzentration im Blut und somit für die Tumorzelle leicht verfügbar. Daher dient die Glutaminolyse der Tumorzelle als Quelle für Stickstoff und Kohlenstoffgrundgerüsten für anabole Prozesse (Dang 2010b; Dang 2010a; Kappler et al. 2017). Zudem wird über die Bildung von Malat aus Succinat, welches aus α -Ketoglutarat aus der Glutaminolyse stammt, NADPH produziert. Bei dieser Reaktion entsteht Pyruvat, welches dann zu Laktat abgebaut wird (Christofk et al. 2008b; Christofk et al. 2008a; Dang 2010b; Spinelli et al. 2017). Wachstumsfaktoren regulieren die Aktivität der Pyruvatkinase und können so die Metabolite der Glykolyse in den Pentosephosphatweg und damit in die Nukleotidsynthese sowie in die Aminosäuresynthese dirigieren (Vander Heiden et al. 2009).

Die Kohlenstoffmoleküle zur Fettsäuresynthese stammen überwiegend aus Zwischenprodukten der Glykolyse. So wird Pyruvat über eine Einschleusung in den Zitratzyklus in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA und weiter zu Zitrat metabolisiert. Bei hohen ATP/ADP und NADH/NAD⁺-Gradienten gelangt Zitrat

Unter Normoxie wird HIF1 α über verschiedene Onkogene und deren Signalwege akkumuliert, so zum Beispiel über den RAS-MAPK-Pathway (Sheta et al. 2001), Her2neu (Laughner et al. 2001) oder den PI3K-pathway mittels AKT-abhängiger Aktivierung von mTOR (Pore et al. 2006; Zundel et al. 2000).

Die Akkumulation von Metaboliten kann ebenfalls eine Stabilisierung von HIF1 α begünstigen. So führt eine Mutation der Succinatdehydrogenase (SDH) zu einer Akkumulation von Succinat, welches die Prolinhydroxylasen (PDHs) der Zellen hemmt, da diese α -Ketoglutarat und O₂ zu Succinat und CO₂ umwandeln. Dieses führt im Ergebnis zu einer Stabilisierung von HIF1 α unter Normoxie (Koivunen et al. 2007; Kappler et al. 2017; Zundel et al. 2000).

Einen Überblick über die HIF1-vermittelte Regulation des Metabolismus der Tumorzellen zeigt Abbildung 2.

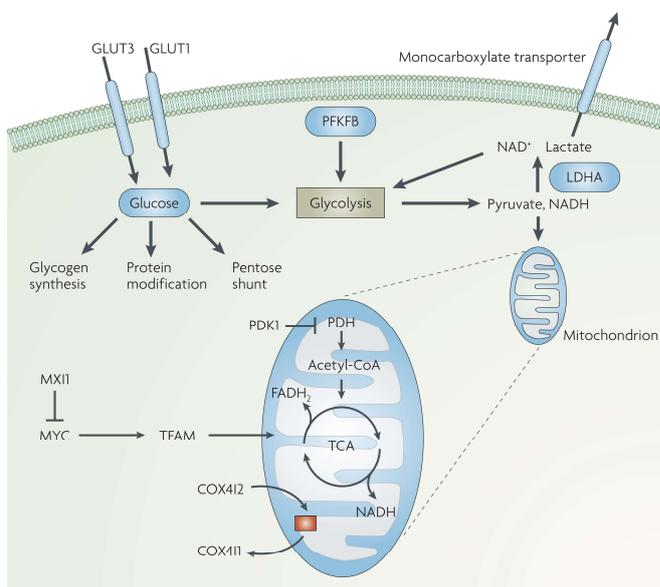


Abb. 2 Kernprozesse von HIF1 α in der Tumorzelle, links Glykolyse. Aus: Denko 2008

HIF1 hat eine äußerst wichtige Bedeutung für die Glykolyse, da alle ihre 12 Enzyme zumindest teilweise über HIF1 reguliert werden (Tabelle 1) (Iyer et al. 1998; Denko 2008).

Tab. 1 Über HIF1 regulierte Glykolyseenzyme (modifiziert nach Denko 2008)

Produkte der durch HIF1 vermittelten Genaktivierung im Rahmen der Glykolyse	Funktion
GLUT1 und GLUT3	Glukosetransport in die Zelle
HK2	Phosphorylierung der Glukose
PGI, PFK1, Aldolase, TPI, GAPDH, PGK, PGM, Enolase, PK, PFKFB1-4	Glykolyse
LDHA	Umwandlung von Pyruvat zu Laktat
MCT4	Laktatausschleusung aus der Zelle
PDK1, MXI1	Verminderung der mitochondrialen Aktivität
COX4I2, Lon Protease	Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs bei Hypoxie

Der Abbau intrazellulärer Glukose wird in seiner Geschwindigkeit durch die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-phosphat über die Enzyme Hexokinase 1 (HK1) und Hexokinase 2 (HK2) bestimmt. Dabei scheint HK2 unter hypoxischen Bedingungen wichtiger zu sein (Mathupala et al. 1995).

6-phosphofructo-2-kinase/Fruktose 2,6-bisphosphatase (PFKFB3) ist ein bidirektionales Enzym welches die höchste Kinaseaktivität aller Isoformen der PFKFB hat (Yalcin et al. 2009). Sie wird in ihrer Kinaseform auch als Phosphofruktokinase 2 bezeichnet (PFK2) (Ros und Schulze 2013). Neben der Phosphorylierung von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-2,6-Bisphosphat als wichtigem Schritt in der Glykolyse, besitzt PFKFB3 auch im Zellkern Kinaseaktivität und stimuliert hier CDKs zur Phosphorylierung von p27. Somit wird die proapoptotische Aktivität von p27 gehemmt und der Übergang in die S-Phase gefördert (Yalcin et al. 2014).

Die Rate der Glykolyse wird aufgrund der Reversibilität der einzelnen Schritte durch die Verfügbarkeit von Substrat und Produkt bestimmt und so erreicht die Zelle über eine gesteigerte Expression an Glykolyseenzymen einen höheren Glukoseabbau (Denko 2008). Die Phosphofruktokinase 1 (PFK1) wird jedoch durch hohe ATP-Konzentrationen gehemmt. Dieser Hemmung wirkt die allosterische Aktivierung durch Fruktose 2,6-bisphosphat entgegen. Zudem unterliegt PFKFB3/PFK-2 nicht der negativen Rückkopplung über ATP, es wird also auch bei hohen ATP-Konzentrationen Fruktose 2,6-bisphosphat gebildet (Ros und Schulze 2013).

Über die Glykolyse anfallendes Pyruvat wird unter Normoxie in die Mitochondrien geschleust und hier der oxidativen Phosphorylierung zugeführt. Unter hypoxischen Bedingungen und durch die aerobe Glykolyse akkumulieren aufgrund der alterierten mitochondrialen Funktion Pyruvat und NADH jedoch im Zytosol. Über HIF1 wird die Lactatdehydrogenase A (LDHA) induziert und katalysiert die Reaktion von Pyruvat und NADH zu Laktat und NAD⁺ (Firth et al. 1995). Laktat wird über den HIF1-induzierten monocarboxylate transporter 4 (MCT4) aus der Zelle geschleust (Bensaad et al. 2006). Durch diesen Schritt wird zugleich das überschüssige Pyruvat entsorgt und NAD⁺ für die Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) und somit für weitere Zyklen der Glykolyse regeneriert (Denko 2008).

HIF1 reguliert die Mitochondrienfunktion über drei Mechanismen herunter:

(1) Über eine Induktion der Pyruvatdehydrogenasekinase 1 (PDK1) wird die Pyruvatdehydrogenase 1 (PDH1) phosphoryliert und damit gehemmt. So kann Pyruvat nicht weiter zu Acetyl-CoA abgebaut werden, Pyruvat wird somit am Eintritt in den Zitratzyklus gehindert und aufgrund der gleichzeitig verminderten NADH-Produktion fehlen die Redoxäquivalente für die Elektronentransportkette (Patel und Korotchkina 2001).

(2) Über eine Induktion von MXI1 reduziert HIF1 die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle indem MXI1 das Onkogen MYC hemmt und so über eine verminderte Expression von Transkriptionsfaktor A (TCAM) die Expression des mitochondrialen Genoms und die Replikation der mitochondrialen DNA negativ beeinflusst (Li et al. 2005; Roche et al. 2001). Außerdem reguliert HIF1 die Expression des Mitophagie-Rezeptors BNIP3 der über sein LIR-Motiv Autophagosomen an die äußere Mitochondrienmembran bindet (Hamacher-Brady und Brady 2016). Es überrascht in diesem Zusammenhang, dass HIF1 und MYC in der Induktion von Genen der Glykolyse kooperieren, bezüglich der Mitochondrienfunktion aber gegensätzliche Effekte aufweisen (Kim et al. 2007). Zudem werden zahlreiche Gene der Glutaminolyse durch das Protoonkogen MYC transkribiert (Wise et al. 2008).

(3) Darüber hinaus verändert HIF1 die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (COX) indem es zu einem Wechsel der Isoformen der regulatorischen Subeinheiten von COX4I1 zur COX4I2 führt, welche unter Hypoxie offenbar den verbliebenen Sauerstoff besser nutzen kann. (Fukuda et al. 2007).

Es existieren unterschiedliche Vorstellungen, über welche Mechanismen der Warburg Effekt der Tumorzelle einen Wachstums- und Überlebensvorteil bietet. Es wird vermutet, dass die erhöhte Glykolyserate durch die reduzierte mitochondriale Aktivität bedingt ist und nicht umgekehrt (Denko 2008). Daher werden vor allem Veränderungen in den mitochondrialen Funktionen als möglicher Vorteil für die Tumorzelle diskutiert. So wird durch die Aktivierung von HIF1 eine Reduzierung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die als Nebenprodukt der Atmungskette in den Mitochondrien entstehen, beschrieben, welche in einigen in-vitro-Studien zu einem Überlebensvorteil dieser Zellen geführt hat (Kim et al. 2006b; Pore et al. 2006; Fukuda et al. 2007). Zudem scheint eine reduzierte Mitochondrienaktivität eine höhere Verfügbarkeit an anabolen Substraten zu bewirken. Über die PDK1 wird hierbei die Einschleusung des Pyruvats in den Zitratzyklus verhindert. Durch den Switch zur COX-Subeinheit COX4I2 wird der Fluss von Kohlenstoffmolekülen in die Atmungskette verringert, welche dann für die Lipidsynthese zur Verfügung stehen. Ein weiterer Vorteil der reduzierten Mitochondrienfunktion und der dadurch bedingten Verringerung des O₂-Verbrauchs könnte die Verfügbarkeit von Sauerstoff für alternative Zwecke sein (Denko 2008). So werden HIF1 α , die HIF-Zielgene und die entsprechenden metabolischen Prozesse bereits bei milder Hypoxie der Zelle induziert. Hierbei wäre noch eine stabile oxidative Phosphorylierung möglich. Trotzdem wird bereits zu diesem Zeitpunkt über PDK1-Induktion MXI1-Induktion und COX4I1-Expression die mitochondriale

Aktivität gehemmt und damit der Sauerstoffverbrauch vermindert. Da die Sauerstoffversorgung gefäßferner Tumoranteile durch Diffusionsgradienten von O₂ begrenzt wird, verhindert ein geringerer Sauerstoffverbrauch hier den anoxischen Zelltod und die Tumorzellen können weiter proliferieren (Evans et al. 2001; Secomb et al. 1995). Zudem steht der Sauerstoff damit anderen sauerstoffabhängigen nicht-mitochondrialen Prozessen wie Steroidsynthese und Proteinfaltung zur Verfügung (Herst und Berridge 2007; Rosenfeld et al. 2002).

Durch die Entwicklung geeigneter Substanzen zur Beeinflussung von Glykolyse, HIF1 oder Hypoxie ergeben sich somit interessante therapeutische Ansatzpunkte (Denko 2008). Dabei werden Substanzen entwickelt, die direkt die Glykolyse inhibieren wobei 2-Desoxy-D-Glukose (2-DG) als kompetitiver Inhibitor und Londamine als putativer Hexokinaseinhibitor in klinischen Studien als Monotherapie oder in Kombination zu konventionellen Chemotherapeutika untersucht werden. In letzterem Fall wird die Rolle als Chemosensitizer untersucht. In der klinischen Anwendung scheint jedoch eine erhebliche Toxizität limitierend zu sein (Singh et al. 2005). Zudem ist möglicherweise nicht die gesteigerte Glykolyse sondern die reduzierte Mitochondrienaktivität für den Schutz der Tumorzelle vor Apoptose und somit auch vor chemotherapeutischem Zelltod verantwortlich, was den Einsatz als Chemosensitizer erheblich limitieren würde (Denko 2008). In anderen Untersuchungen konnte bei einer Kolonkarzinomzelllinie gezeigt werden, dass durch Silencing des Hexokinase 2 Gens die Sensitivität für 5-Fluorouracil zunimmt (Peng et al. 2009).

Über die Entwicklung von HIF1-Inhibitoren könnten die Einflüsse von HIF1 auf den Zellmetabolismus und auch andere Mechanismen wie beispielsweise die HIF1-induzierte Tumorneoangiogenese gehemmt werden (Fulda und Debatin 2007; Giaccia et al. 2003; Semenza 2003). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass nur ein Teil der Glykolyse der Kontrolle von HIF1 unterliegt. Über die gesteigerte Mitochondrienaktivität wird der Sauerstoffverbrauch erhöht, womit Resistenz gegen Strahlen- und Chemotherapie hervorgerufen wird. Allerdings werden die Tumorzellen sensitiver für hypoxische Toxine wie Tirapazamin (Beck et al. 2007). Möglicherweise ist der Angriffspunkt anderer drugable targets downstream von HIF1 ein effektiverer und kontrollierterer Ansatz. Zudem besteht wegen der Glukoseabhängigkeit der Zellen des zentralen Nervensystems die Notwendigkeit der Entwicklung einer Substanz, welche die Blut-Hirn-Schranke nicht oder nur in geringerem Maße überwindet (Singh et al. 2005).

Ein weiterer Ansatz besteht in der Kombination von gegen Mitochondrien gerichteten Substanzen (MTD) mit 2-DG. So konnte in Zellkulturen gezeigt werden, dass die kombinierte Therapie mit MTD und 2-DG zu einer signifikanten Tumorrogression führte, während keine morphologischen Veränderungen in Zelllinien von Niere, Leber oder Herz auftraten (Cheng et al. 2012).

Unbestritten ist gegenwärtig jedoch der additive prognostische Effekt von HIF1 α beziehungsweise dessen Targetproteinen zur individuellen Prognosekalkulation (Eckert 2009).

2. Zielstellung der Arbeit

Plattenepithelkarzinome von Mundhöhle und Oropharynx machen unter den Kopf-Hals Tumoren den größten Anteil aus. Trotz einiger Fortschritte in der Diagnostik und Therapie dieser Tumoren hat sich die Prognose in den letzten Jahrzehnten nur unwesentlich verbessert. So liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate nur bei etwa 50%. Neben der operativen Entfernung des Tumors inklusive der Halslymphknoten ist die Strahlen- und Chemotherapie integraler Bestandteil der Behandlung fortgeschrittener Tumoren.

Die klassischen Prognoseparameter der TNM-Klassifikation und die histopathologische Graduierung des Tumors haben sich für eine Prognoseabschätzung als nicht ausreichend erwiesen. Daher wird intensiv nach anderen Parametern gesucht, die eine verlässliche Einschätzung der Aggressivität des Tumors erlauben um das klinische Management dementsprechend auszurichten. Dabei gilt das besondere Interesse der Detektion von Biomarkern, welche mit verhältnismäßig wenig Aufwand in der klinischen Routine bestimmt werden können.

Schon mit der Beschreibung der aeroben Glykolyse durch Otto Warburg wurde deutlich, dass sich Tumorzellen in ihrer metabolischen Funktion deutlich von Normalgewebe unterscheiden. Zudem wurde im Lauf der Zeit deutlich, dass nicht nur Hypoxie, sondern auch die Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen einen wichtigen Einfluss auf den Metabolismus nehmen. HIF1 und einige durch diesen Transkriptionsfaktor aktivierte Enzyme der Glykolyse konnten bereits als adverse prognostische Faktoren identifiziert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels immunhistochemischen Methoden zwei relevante, bisher für das Plattenepithelkarzinom von Mundhöhle und Oropharynx noch nicht im Detail untersuchte Enzyme der Glykolyse nachzuweisen und sie hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft zu evaluieren. Mit Hexokinase 2 handelt es sich dabei um das Enzym, welches den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse katalysiert. PFKFB3 ist die Isoform eines Enzyms, welches über seine Funktion als Phosphofruktokinase-2 (iPFK2), Fruktose-2,6-bisphosphat bildet. Dieses aktiviert allosterisch die Phosphofruktokinase-1 und ist somit ein wichtiger Metabolit zur Regulierung der Glykolyse (Yalcin et al. 2009).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientenkollektiv

Die Zusammenstellung des Patientenkollektivs erfolgte aus den Tumoroperationen der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie von Februar 2009 bis Juni 2014.

Es wurden hierbei Plattenepithelkarzinome von Mundhöhle und Oropharynx berücksichtigt, welche im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie im amedes Institut für Pathologie, Zytodiagnostik und Humangenetik in Halle GmbH diagnostiziert wurden. Es wurde repräsentatives paraffin-eingebettetes Tumormaterial von 116 Patienten ausgewählt. Ausgeschlossen waren Patienten mit Karzinomen der Lippe, sowie Patienten, bei denen keine vollständige Tumorklassifikation erstellt werden konnte.

Fehlende klinische Daten wurden retrospektiv anhand der Berichte des Tumorzentrums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und der histopathologischen Befundberichte des Instituts für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie des amedes Instituts für Pathologie, Zytodiagnostik und Humangenetik in Halle GmbH erhoben. Zudem wurden die Patientenakten der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie sowie das klinische Krebsregister Halle zur Vervollständigung der Überlebensdaten herangezogen. Die Daten lagen in Form einer Datenbank im Format SPSS vor. Erhoben wurden hier Alter, Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, OP-Datum, Sterbedatum, T-, N- und M-Stadium und Tumorlokalisation.

3.1.2 Histologische Untersuchung

Die histologischen Untersuchungen an den Präparaten erfolgten in den Jahren 2009 bis 2014. Es erfolgte eine erneute fachärztliche pathologisch-anatomische Begutachtung der Präparate um entsprechende Schnittpräparate für die nachgestellten immunhistochemischen Untersuchungen auszuwählen. Dabei wurden Tumoranteile ausgewählt, die den Gesamttumor unter histologischen Gesichtspunkten (Morphologie, Infiltrationsmuster) am besten repräsentierten. Zudem wurde darauf geachtet, daß ausreichend vitale Tumorzellen vorhanden waren und der Anteil nekrotischen Tumors diese nicht überwog. Etwaige fehlende Daten (Graduierung, Tumorstadium) konnten ergänzt werden.

3.1.3 Graduierung

Die Graduierung der Plattenepithelkarzinome erfolgt mittels eines dreistufigen Systems anhand der Ähnlichkeit zu ihrem Ursprungsgewebe. So wird die Ausbildung von Interzellularbrücken bewertet und eine Verhornungstendenz einzelner Zellen oder von Zellgruppen begutachtet. Hochdifferenzierte Tumoren (G1) ähneln demnach dem normalen Plattenepithel sehr stark. Niedrig differenzierte (G3) Karzinome zeigen dagegen nur wenig Ähnlichkeiten mit dem squamösen Ausgangsgewebe, Tumoren intermediärer Differenzierung (G2) befinden sich in ihrem Differenzierungsgrad zwischen den beiden vorgenannten. Darüber hinaus werden Veränderungen des Zellkernes bezüglich Kern-Größen-Varianz und Kern-Plasma-Relation zur Graduierung herangezogen. Zudem wird die Induktion einer Stromareaktion im Sinne einer Stromadesmoplasie berücksichtigt, wobei hier die wenig differenzierten Tumoren eine deutlichere Stromainduktion zeigen. Für bestimmte spezielle Typen des Plattenepithelkarzinoms wie das basaloide und das akantholytische Plattenepithelkarzinom und das verruköse und das papilläre Plattenepithelkarzinom ist formal keine Graduierung vorgesehen, sie werden jedoch auch aufgrund ihres biologischen Verhaltens mit einem Grad versehen (verruköses und papilläres Plattenepithelkarzinom als G1, basaloides und akantholytischen Plattenepithelkarzinom als G3) (Agaimy und Weichert 2016).

3.1.4 TNM-Klassifikation

Die Einteilung erfolgte anhand der zum Zeitpunkt der Datenerhebung aktuellen 7. Auflage der TNM-Klassifikation in der Version der UICC (Wittekind und Meyer 2013; Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF) 2012). Hierbei wird der Primärtumor (T-Stadium) hinsichtlich seiner Größe, Eindringtiefe und Infiltration von Nachbarorganen begutachtet. Die Anzahl und Lokalisation der lymphonodalen Metastasen sowie deren Größe bestimmen den Nodalstatus (N-Stadium). Das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen definiert das M-Stadium (Tabelle 3.1, 3.2). Die in der 8. Auflage erfolgten Änderungen hinsichtlich der primären Bestimmung von p16 und der Änderung des Nodalstatus wurden in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt, da die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen zum Zeitpunkt der Veröffentlichung bereits abgeschlossen waren.

Tabelle 3 TNM-Klassifikation (7.Auflage) der Karzinome der Mundhöhle (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF) 2012; Wittekind und Meyer 2013)

Klassifikation	Parameter
T1	Tumor maximal 2 cm
T2	Tumor größer als 2 cm, maximal 4 cm
T3	Tumor über 4 cm
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen
T4a	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert Spatium mastoideum, Processus pyramidalis oder Schädelbasis oder umschließt A. carotis interna
N1	Solitäre ipsilaterale Metastase, maximal 3 cm
N2a	Solitäre ipsilaterale Metastase über 3 cm, maximal 6 cm
N2b	Mehrere ipsilaterale Metastasen ipsilateral, keine über 6 cm
N2c	Metastasen bilateral oder kontralateral keine über 6 cm
N3	Metastase über 6 cm
M1	Fernmetastasen

Tabelle 4 TNM-Klassifikation (7. Auflage der Karzinome des Oropharynx (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF) 2012; Wittekind und Meyer 2013)

Klassifikation	Parameter
T1	Tumor maximal 2 cm
T2	Tumor größer als 2 cm, maximal 4 cm
T3	Tumor über 4 cm oder Tumorausbreitung auf linguale Fläche der Epiglottis
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen
T4a	Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus, Lamina medialis des Processus pterygoideus, harter Gaumen, Unterkiefer
T4b	M. pterygoideus lat., Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis, tumoröse Ummauerung der A. carotis interna
N1	Solitäre Metastase, maximal 3 cm
N2a	Solitäre ipsilaterale Metastase über 3 cm, maximal 6 cm
N2b	Mehrere ipsilaterale Metastasen ipsilateral, keine über 6 cm
N2c	Metastasen bilateral oder kontralateral keine über 6 cm
N3	Metastase über 6 cm
M1	Fernmetastasen

3.1.5 Antikörper und Zielantigene

Hexokinase katalysiert den ersten Schritt der Glykolyse, die Reaktion von Glukose in Glukose-6-Phosphat. Beim Menschen sind vier Isoformen der Hexokinase beschrieben. Die Hexokinase 2 spielt eine entscheidende Rolle zur Aufrechterhaltung der aeroben Glykolyse neoplastischer Zellen, indem sie den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse katalysiert. Nur für diese Isoform der Hexokinase ist eine Überexpression in Tumoren beschrieben (WARBURG 1956; Ahn et al. 2009; Wu et al. 2017).

Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) ist ein bifunktionales Enzym welches in seiner dephosphorylierten Form (Phosphofruktokinase-2) die Phosphorylierung von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-2,6-Bisphosphat katalysiert. Von den vier beim Menschen vorkommenden Isoformen ist für die PFKFB3/iPFK-2 gezeigt worden, dass sie durch Hypoxie induziert wird und so zu einer erhöhten Glykolyse führen kann (Kim et al. 2006a; Minchenko et al. 2002). Zudem konnte eine erhöhte Expression in menschlichen Krebszellen nachgewiesen werden (Atsumi et al. 2002). Von den vier Isoformen hat PFKFB3 die höchste Kinase-Aktivität (Yalcin et al. 2009).

Es wurden Primärantikörper der Firma Cell Signaling Technology® verwendet (Tabelle 3.4).

Tabelle 5 Verwendete Primärantikörper

Antigen	AK-Hersteller	Molekulargewicht	AK-Verdünnung	Quelle
Hexokinase 2	Cell Signaling Technology®	102 kDa	1:100	Kaninchen
PFKFB3 (D7H4Q)	Cell Signaling Technology®	70 kDa	1:50	Kaninchen

3.2 Methoden

3.2.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Vom formalinfixierten paraffineingebetten Tumormaterial wurden jeweils 3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen (KNITTEL Starfrost®). Die Schnittpräparate wurden im Wärmeschrank bei 60 Grad für 30 Minuten getrocknet.

3.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Vorbehandlung der Gewebeschnitte zur Entparaffinierung, Rehydrierung und hitzeinduzierte Epitopdemaskierung erfolgte standardisiert über den Automaten PT Link® (Firma Dako/Agilent Technologies). Dazu wurden die Schnittpräparate für die Immunreaktion mit dem Antikörper gegen

PFKFB3 im entsprechenden Objektträgergestell in den mit Tris/EDTA-Puffer pH9 (Target Retrieval Solution, High pH, concentrated 10x, Fa. DAKO) befüllten und auf 65 Grad Celsius vorgeheizten Edelstahlbehälter des Automaten eingebracht. Anschließend wurden die Schnittpräparate zur Demaskierung der Epitope 20 Minuten bei 97 Grad inkubiert. Für die Reaktion mit dem Antikörper gegen Hexokinase II wurde der gleiche Vorgang mit Zitratpuffer, pH6 (Target Retrieval Solution, citrate pH6, Fa. DAKO) durchgeführt. Nach Abkühlen auf 65 Grad wurden die Präparate sofort mit Waschpuffer gespült. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurde den Gewebeschnitte Wasserstoffperoxid (FLEX Peroxidase Block, Fa. DAKO®) zugesetzt, für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit Waschpuffer gespült. Die Primärantikörper wurden aufgebracht und es wurde nach 25minütiger Inkubation erneut mit Waschpuffer gespült.

Die Signalverstärkung der Bindung des Sekundärantikörpers erfolgte durch Enzym-Anti-Enzym-Komplextechnik. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der Kopplung des Sekundärantikörpers mit einem Enzym-Anti-Enzym-Komplex der von derselben Spezies stammt wie der Primärantikörper. Es bildet sich dabei ein stabiler Komplex, bei dem am Ende jedes Antigen durch mindestens drei aktive Moleküle des Enzyms markiert wird (Romeis et al. 2010).

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde hierzu die Peroxidase-Anti-Peroxidase-Technik verwendet. Dabei handelt es sich um die Kopplung von Meerrettichperoxidase-Molekülen und Sekundärantikörpern (EnVision™ FLEX/HRP Detection Reagent, Fa. DAKO). Nach 10minütiger Inkubationszeit mit diesem Reagens wurde weitere 10 Minuten mit dem Substratsystem inkubiert (EnVision™ FLEX DAB+Chromogen, Fa. DAKO). Dieses besteht aus Diamenzobenzidinlösung (DAB) und wasserstoffperoxidhaltigem Puffer. Durch die Umsetzung des Peroxids wird DAB oxidiert und es entsteht ein brauner unlöslicher Farbniederschlag am Ort des Zielantigens. Zur Kerngegenfärbung wurde mit Hämaunlösung nach Mayer für 5 Minuten inkubiert und anschließend in Leitungswasser für 5 Minuten gebläut. Die Fixierung der Präparate erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe an deren Ende sich das Eindecken mit Xylol anschloss (Eindeckautomat Tissue-Tek®, Fa. SAKURA).

3.2.3 Mikroskopische Auswertung

Die fachärztliche pathohistologische Untersuchung und Auswertung der angefertigten immunhistochemischen Präparate erfolgte mittels des Lichtmikroskops NX40 (Firma Nikon) durch den Autor. Als interne Positivkontrolle dienten ruhende Lymphozyten, als Negativkontrolle nicht mit Primärantikörper behandelte Präparate. Es wurde hierbei zum einen die Expression des gesamten im Schnitt erfassten Tumormaterials begutachtet. Darüber hinaus wurde die Expression im Bereich der

Invasionsfront gesondert erfasst. Dem Untersucher lagen zum Zeitpunkt der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen keine Information über das Tumorstadium des jeweiligen Patienten vor.

3.2.4 Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner

Die Auswertung erfolgte über den semiquantitativen immunreaktiven Score nach Remmele. Hierbei wird der prozentuale Anteil positiver Tumorzellen (PP) und die Signalintensität (SI) erfasst und mittels Multiplikation ein Scorewert ermittelt der zwischen 0 und 12 liegen kann (Tabelle 3.5). Werte größer oder gleich 3 werden dabei als positive Immunreaktion gewertet (Remmele und Stegner 1987).

Tabelle 3.4 Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner.

Positive Zellen in Prozent (PP)	Punkte PP	Färbeintensität (SI)	Punkte SI
Keine positiven Tumorzellen	0	Keine Färbereaktion	0
< 10% positive Tumorzellen	1	Schwache Färbereaktion	1
10-50% positive Tumorzellen	2	Mäßige Färbereaktion	2
51-80% positive Tumorzellen	3	Starke Färbereaktion	3
>80% positive Tumorzellen	4		
Zur Bestimmung des IRS werden PP und SI multipliziert. Der Score reicht von 0 bis 12.			

3.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mittels des Programms SPSS Statistics (SPSS Inc. Released 2006. SPSS for Windows, Version 15.0. Chicago, SPSS Inc.) durchgeführt. Mittels χ^2 -Test wurde dabei die Assoziation der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen zu den klinischen Parametern untersucht. Diese waren Alter, Geschlecht, Tumorstadium und Nodalstatus.

Zur Darstellung der Korrelation der Expression der Glykolyse-Proteine auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben wurde die multivariate Cox-Regressionsanalyse adjustiert nach T-

Stadium und Grading verwendet. Es sollten hierbei die Unabhängigkeit der Parameter vom Gesamtüberleben und die prognostische Signifikanz ermittelt werden. Bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Alters- und Geschlechtsverteilung, Überleben

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 25 und 86 Jahren alt. Der Mittelwert (Mean) betrug 58,7 Jahre (95% Konfidenzintervall 56,5 - 60,9), der Altersmedian lag bei 54,5 Jahren.

Es handelte sich um 90 männliche (78%) und 26 weibliche (22 %) Patienten, wobei der geschlechtsspezifische Mittelwert für das Alter bei den Männern bei 57,4 Jahren (Median 56 Jahre) und bei den Frauen bei 63,0 Jahren (Median 62,5 Jahre) lag.

Im Erhebungszeitraum (2009 bis 2016) verstarben 64 Patienten (55,2%), 52 Patienten (42,1%) waren nicht verstorben.

4.2 Tumorklassifikation und Graduierung

Die Tumorklassifikation inklusive Tumorstadium, Metastasierungsstatus hinsichtlich lokalen lymphonodalen Karzinometastasen und Fernmetastasierung sowie die Graduierung konnte für alle 116 Fälle erhoben werden. Eine Zusammenfassung findet sich in Tabelle 4.1.

Tab. 6 Tumorklassifikation entsprechend TNM

Tumorstadium	Gesamt	Männer	Frauen
pT1	23 (19,8%)	18 (20,0%)	5 (19,3%)
pT2	34 (29,4%)	23 (25,5%)	11 (42,3%)
pT3	20 (17,2%)	15 (16,7%)	5(19,2%)
pT4	39 (33,6%)	34 (37,8%)	5(19,2%)
Nodalstadium			
pN0	53 (45,7%)	39 (53,3%)	14 (53,8%)
pN1	14 (12,1%)	10 (11,1%)	4 (15,4%)
pN2	44 (37,9%)	36 (40,0%)	8 (30,8%)
pN3	5 (4,3%)	5 (5,6%)	0 (0%)
Fernmetastasierung			
M0	112 (96,6%)	87 (96,7%)	25 (96,2%)
M1	4 (3,4%)	3 (3,3%)	1 (3,8%)

Es war ein Überwiegen der fortgeschrittenen Karzinome der Tumorstadien pT3 und pT4 gegenüber den Tumorstadien pT1 und pT2 (50,8% vs. 49,2%) zu verzeichnen. Bei den Männern war dieses besonders auffällig (54,5% vs. 45,5%) während bei den Frauen deutlich mehr Tumoren der klinisch günstigeren Stadien pT1 und pT2 zu finden waren (61,6% vs. 38,4%).

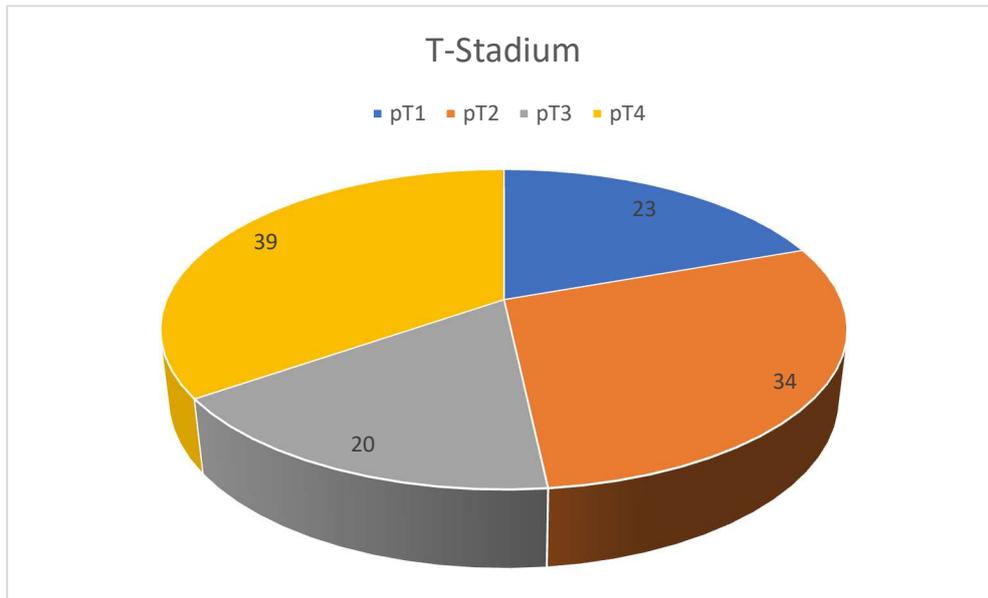


Abb. 3 Tumor (T-)Stadien bei 116 Patienten mit OSCC

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung waren nur 53 Patienten (45,7%) Fällen ohne lymphonodale Karzinommetastasen (pN0). Dabei wiesen 58 Patienten (50 %) hier bereits lymphonodale Metastasen des Stadiums pN1 und pN2 auf. Das höchste Stadium pN3 fand sich demnach nur bei 5 Patienten (4,3%). Fernmetastasen wurden nur bei 4 Patienten (3,3%) gefunden während bei 112 Patienten (96,6%) ein Stadium M0 vorlag.

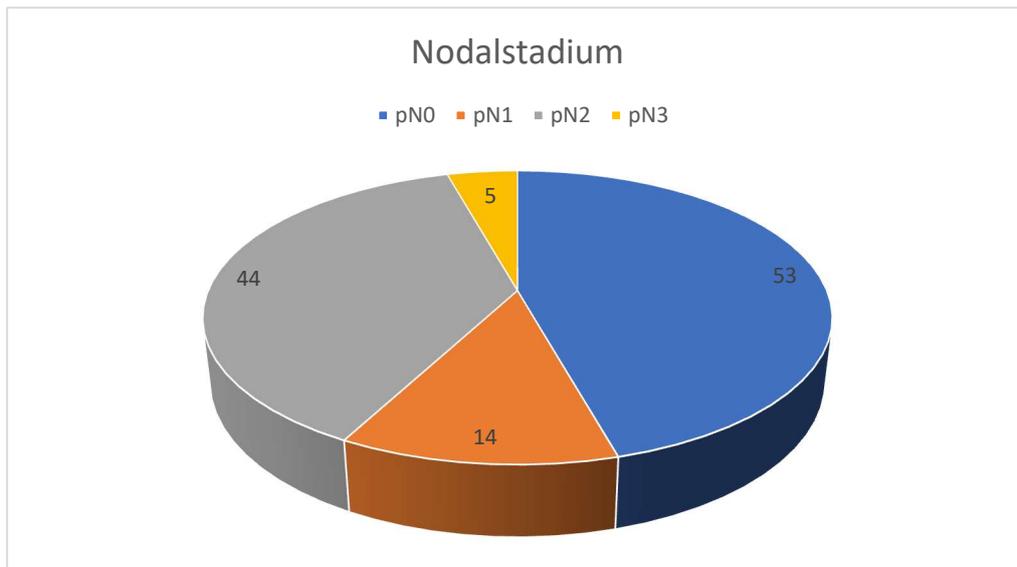


Abb. 4 N-Stadium bei 116 Patienten mit OSCC

Bezüglich der Graduierung fanden sich 14 (12,1%) hochdifferenzierte Karzinome (G1), 81 (69,8%) mäßiggradig differenzierte Karzinome (G2) und 21 (18,1%) schlecht differenzierte Karzinome (G3). Eine mögliche Ursache dieser Verteilung ist auch in der häufig nachweisbaren zentralen Tendenz bei dreistufigen Graduierungssystemen zu sehen, bei denen der Grad 2 meist überrepräsentiert ist.

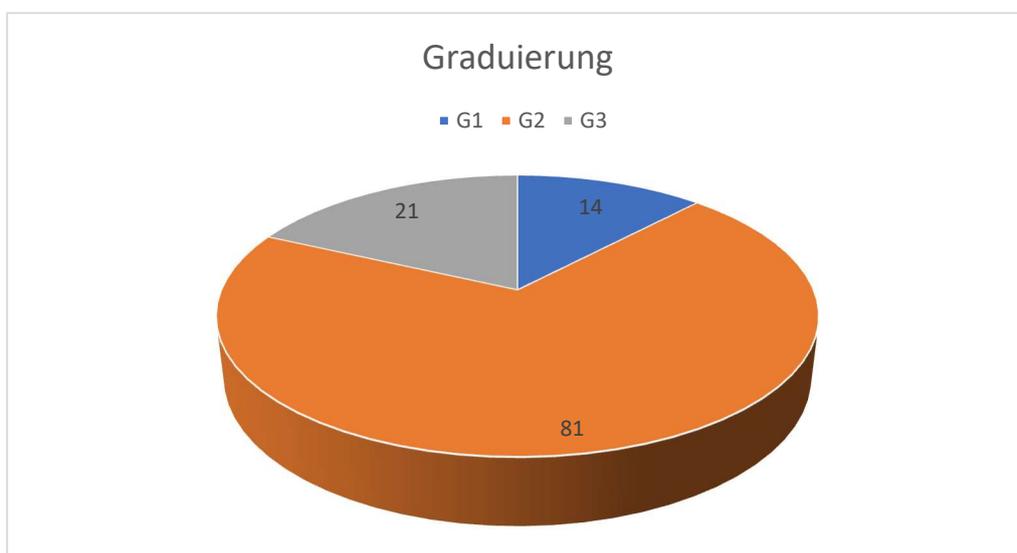


Abb. 5 Graduierung der Tumoren von 116 Patienten mit OSCC

4.3 Überlebensraten in Abhängigkeit von TNM-Stadium, Graduierung und Patientenalter

Die Fünf-Jahres-Überlebensrate des Patientenkollektivs betrug 40 %, die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 6 zu sehen.

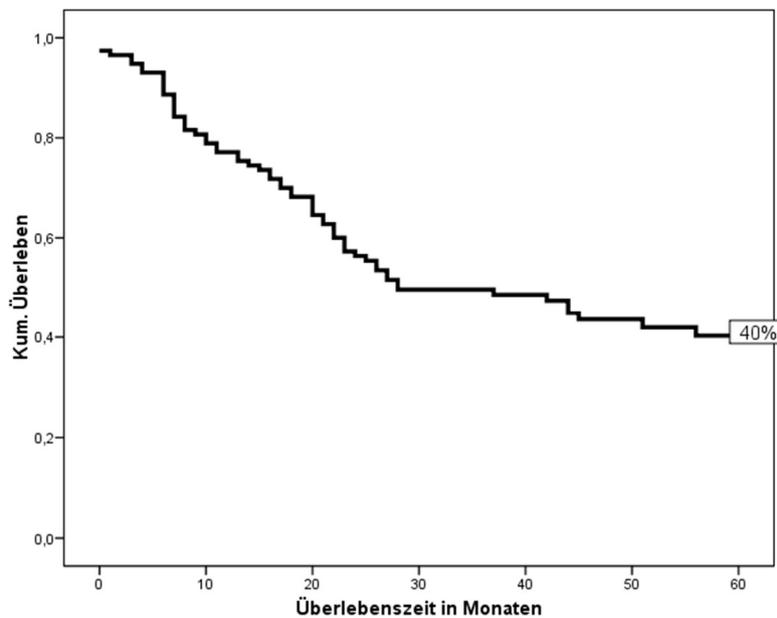


Abb. 6 Fünf-Jahres-Überlebensrate des Patientenkollektivs (n=116)

Wie Abbildung 7 zeigt, hatten Frauen ein schlechteres Gesamtüberleben als Männer. Dieses ist insofern bemerkenswert, da wie bereits gezeigt, die Tumoren der Frauen häufiger in den Stadien T1 und T2 gefunden wurden als die bei den Männern.

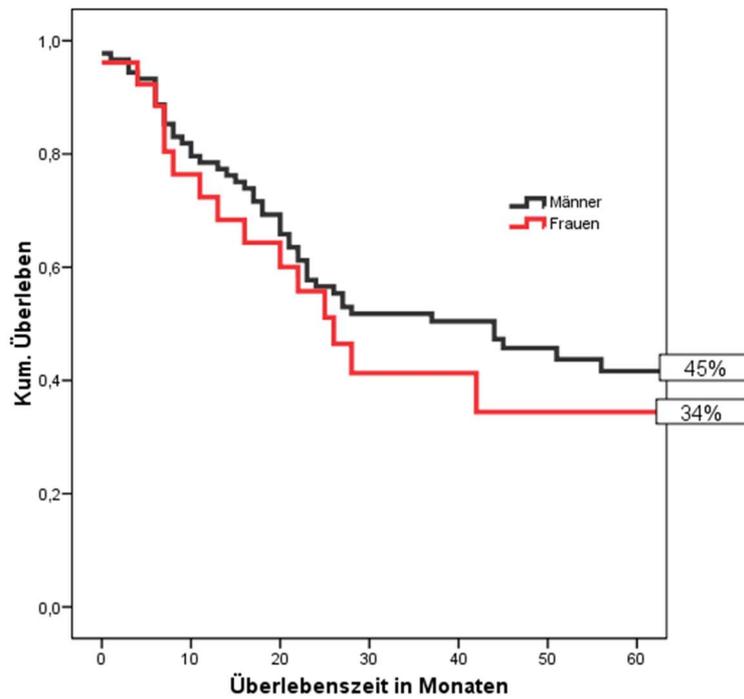


Abb. 7 Fünf-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom Geschlecht

Daneben war es von Interesse, in welcher Form sich die jeweiligen pTNM-Stadien auf das jeweilige Überleben der Patienten auswirkte. In Abbildung 8 zeigt sich, dass Patienten mit pT1-Tumoren ein wesentlich besseres Überleben als Patienten mit Stadium pT2 und pT3 hatten. Von den Patienten mit Stadium pT4 waren nach 5 Jahren nur noch 18 % am Leben.

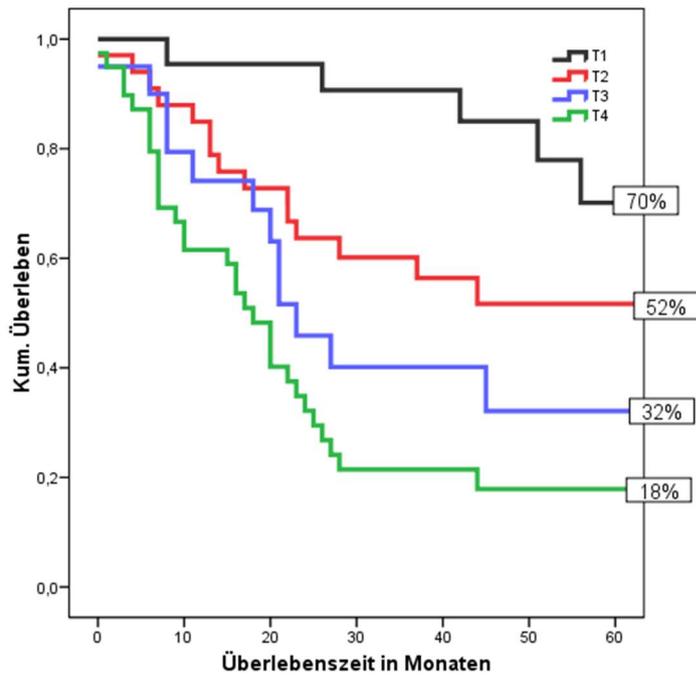


Abb. 8 Fünf-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom T-Stadium

Auch Patienten mit positivem Nodalstatus (pN1-pN3) zeigten ein schlechteres Überleben als solche ohne lymphonodale Metastasen (Abb. 9).

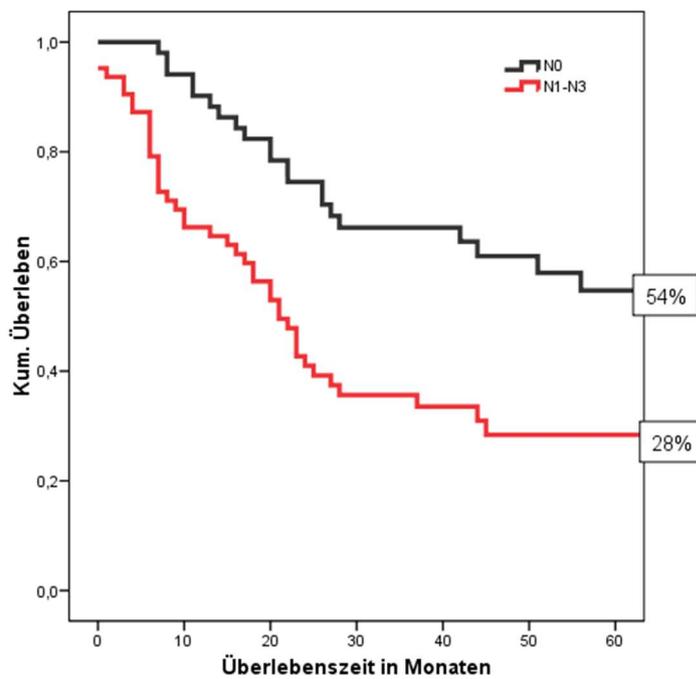


Abb. 9 Fünf-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom Nodalstatus

Bei der histopathologischen Graduierung waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen nachweisbar (Abb. 10).

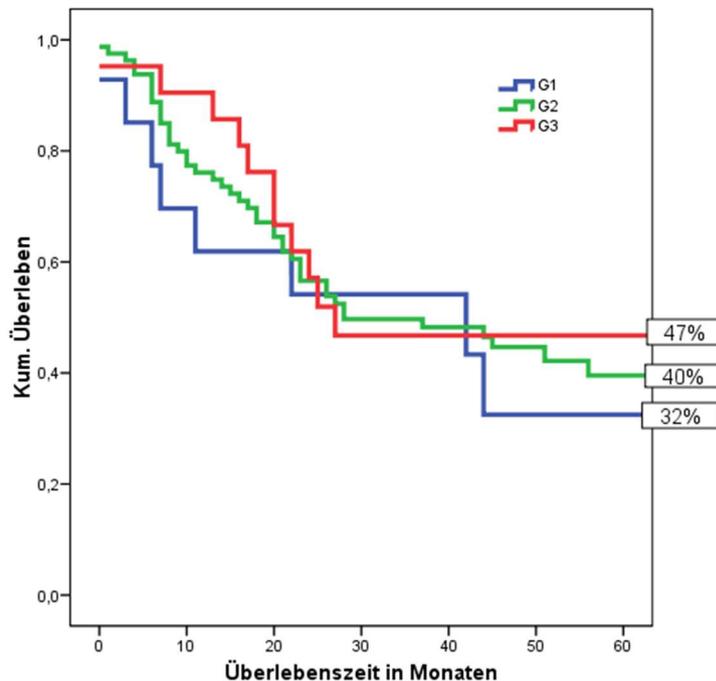


Abb. 10 Fünf-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit von der Graduierung

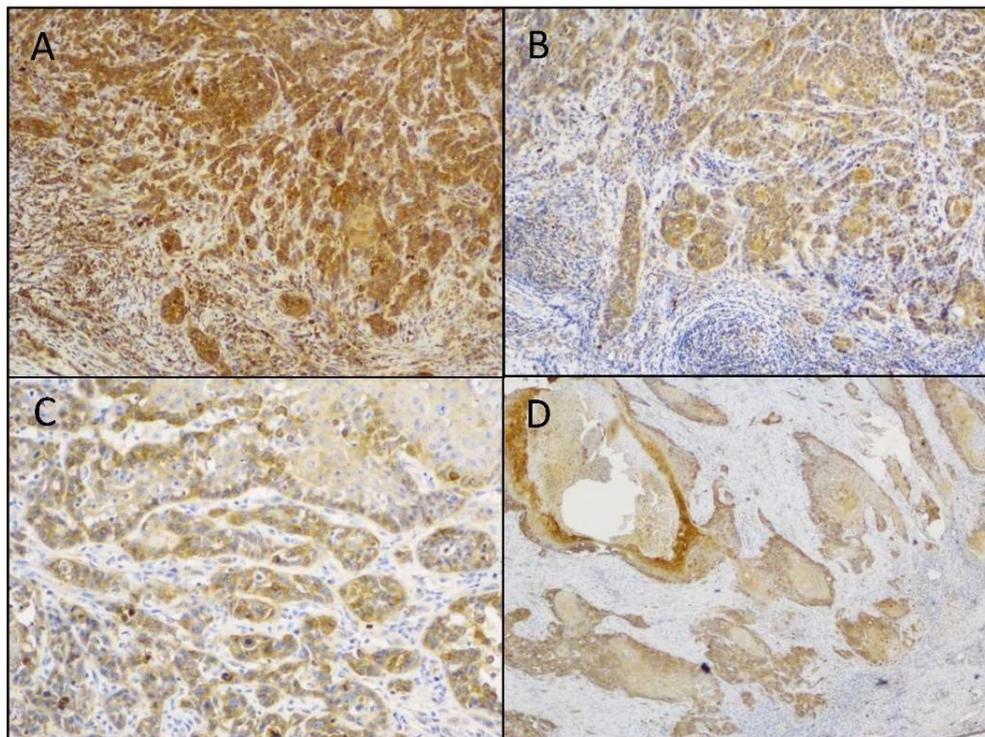
4.4 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen für HK2

Nachfolgend sind die jeweiligen immunhistochemischen Färbungen von HK2 in Korrelation zu pTNM und Grading dargestellt. Aus pathohistologischer Sicht ist die Invasionsfront des Tumors von besonderem Interesse, da hier die Tumor-Stroma-Interaktion stattfindet. Es gibt zahlreiche Arbeiten, die das Wachstumsmuster an der Invasionsfront untersuchen und hierin einen wichtigen Surrogatparameter für die Aggressivität eines Tumors sehen (Boxberg et al. 2019). Daher erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Interpretation des immunhistochemischen Färbeergebnisse zum einen für den Gesamttumor und zum anderen separat für die Invasionsfront. Zugrunde gelegt wurde hier die Kategorisierung der Score-Werte des immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner in die vier Kategorien negativ (0 bis 2), schwach exprimiert (3 -4), moderat exprimiert (6-8) und stark exprimiert (9-12). Dieses ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7 Immunreaktiver Score der Expression von HK2

HK2	IRS Overall	IRS Invasionsfront
0	3 (2,6%)	3 (2,6%)
1	12 (10,3%)	8 (6,9%)
2	8 (6,9%)	5 (4,3%)
3	8 (6,9%)	6 (5,2%)
4	12 (10,3%)	5 (4,3%)
6	25 (21,6%)	20 (17,2%)
8	11 (9,5%)	12 (10,3%)
9	30 (25,9%)	30 (25,9%)
12	7 (6,0%)	27 (23,3%)

In Abbildung 11 sind Färbemuster für Hexokinase 2 exemplarisch in ihrer Intensität dargestellt.



A: HK2 Gesamtexpression IRS 12
C: HK2 Invasionsfront IRS 9

B: HK2 Gesamtexpression IRS 9
D: HK2 Gesamtexpression IRS 8

Abb. 11 Immunhistochemische Darstellung der Expression von Hexokinase 2 (Vergrößerung 100fach)

Tab. 8 Interpretation der Expression von HK2

HK2	IRS Overall	IRS Invasionsfront
Negativ (IRS 0-2)	23 (19,8%)	16 (13,8%)
Schwach (IRS 3-4)	20 (17,2%)	11 (9,5%)
Moderat (IRS 6-8)	36 (31,0%)	32 (27,6%)
Stark (IRS 9-12)	37 (31,9%)	57 (49,1%)
HK2	IRS Overall	IRS Invasionsfront
Low expression (IRS 0-4)	43 (27,1%)	27 (23,3%)
High expression (IRS 6-12)	73 (62,9%)	89 (76,7%)

Im Hinblick auf den Gesamtscore (Overall) ergaben sich dabei 23 negative Fälle, 20 Fälle mit schwacher Expression, 36 Fälle mit moderater Expression und 37 Fälle bei denen HK2 stark exprimiert war. Aus klinischer Sicht ist es sinnvoll zwei Untergruppen zu bilden: negative und schwache Expression (IRS 0-4) sollten dabei mäßiger (IRS 6-8) und starker Expression (IRS \geq 9) gegenübergestellt werden. Fasst man die Expression in diese zwei Untergruppen zusammen ergeben sich insgesamt 43 (27,1%) Fälle mit negativem Färbeergebnis oder schwacher Expression (low expression) und 73 (62,9%) Fälle mit moderater oder starker Expression (high expression).

Bezüglich der Expression an der Invasionsfront zeigten sich 16 negative Fälle, 11 Fälle mit schwacher Expression, 32 Fälle mit moderater Expression sowie 57 Fälle mit starker Expression. Hier ergaben sich somit zwei Untergruppen mit 27 (23,3%) Fällen mit negativer oder schwacher Expression (low expression) sowie 89 (76,7%) Fällen mit moderater oder starker Expression (high expression).

Mittels multivariatem proportionalem Hazards Modell nach Cox (Cox-Regression) zeigte sich für die Expression von HK2 (adjustiert nach Tumorstadium, Nodalstatus, Tumorgrading und Alter) ein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten.

Es zeigte sich (vgl. Abb 12), dass Patienten mit einer hohen Expression von HK2 (IRS 6-12) im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen Expression (IRS 0-4) ein 1,8fach erhöhtes Risiko zu versterben hatten ($p = 0,038$).

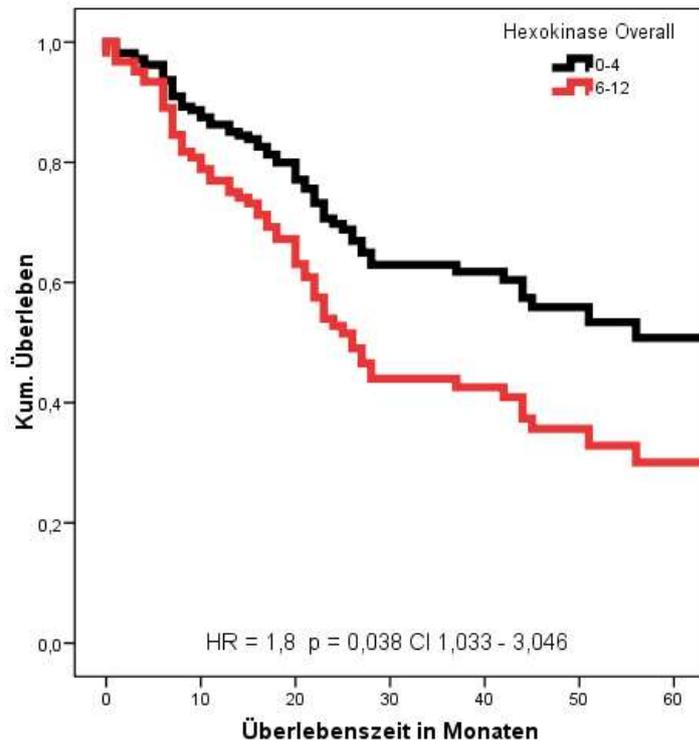


Abb. 12 Cox-Regressionsanalyse für die Intensität der Gesamtexpression von HK2 (Overall). Rot IRS 0-4, Schwarz IRS 6-12 (RR 1,8, $p = 0,038$)

Bei der Auswertung hinsichtlich der Expression an der Invasionsfront des Tumors konnte im Cox-Modell ebenfalls ein signifikanter und sogar noch deutlicherer Unterschied bezüglich des Überlebens nachgewiesen werden.

So erhöhte sich das Sterberisiko bei hoher Expression von HK2 an der Invasionsfront des Tumors um den Faktor 2,4 ($p = 0,012$), wie in Abb. 13 dargestellt ist.

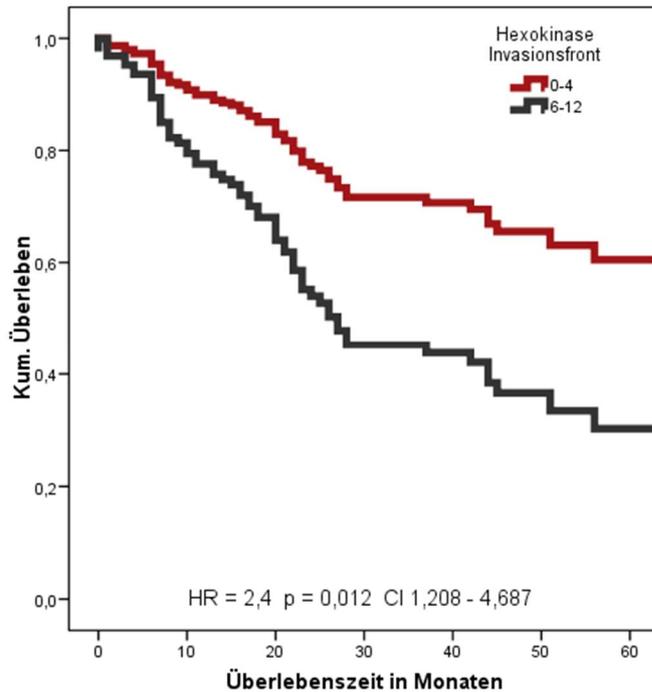


Abb. 13 Cox-Regressionsanalyse für die Intensität Expression von HK2 an der Invasionsfront. Rot IRS 0-4, Schwarz IRS 6-12 (RR 2,4, p = 0,012)

4.5 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen für PFBKFB3

Zur Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung erfolgte zuerst in einer zur HK2-identischen Kategorisierung der Score-Werte des immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner in die vier Kategorien negativ (0 bis 2), schwach exprimiert (3 -4), moderat exprimiert (6-8) und stark exprimiert (9-12). Exemplarische Färbeergebnisse finden sich in Abb. 14 Die jeweilig korrespondierenden Färbeergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Die Tabelle 10 gibt darüber hinaus einen Überblick über die jeweiligen IRS-Scores im Tumorgewebe und an der klinisch und pathologisch wichtigen Invasionsfront unter Berücksichtigung der Kategorien. Es zeigte sich, dass sowohl im Tumorgewebe als auch an der Invasionsfront hohe Expressionen von PFBKFB3 gefunden werden. Die Invasionsfront wies dabei zu über 60% eine sehr starke Färbeintensität auf.

Tab. 9 Immunreaktiver Score der Expression von PFKFB3

PFKFB3	IRS Overall	IRS Invasionsfront
0	4 (3,4%)	4 (3,4%)
1	18 (15,5%)	10 (8,6%)
2	9 (7,8%)	4 (3,4%)
3	4 (3,4%)	5 (4,3%)
4	8 (6,9%)	5 (4,3%)
6	28 (24,1%)	16 (13,8%)
8	3 (2,6%)	1 (0,9%)
9	35 (30,2%)	28 (24,1%)
12	7 (6,0%)	43 (37,1%)

Tab. 10 Interpretation der Expression von PFKFB3 mit Subgruppierung

PFKFB3	IRS Overall	IRS Invasionsfront
Negativ (IRS 0-2)	31 (26,7%)	18 (15,5%)
Schwach (IRS 3-4)	12 (10,3%)	10 (8,6%)
Moderat (IRS 6-8)	31 (26,7%)	17 (14,7%)
Stark (IRS 9-12)	42 (36,2%)	71 (61,2%)
PFKFB3	IRS Overall	IRS Invasionsfront
Low expression (IRS 0-4)	43 (37,1%)	28 (24,1%)
High expression (IRS 6-12)	73 (62,9%)	88 (75,9%)

Die immunhistochemischen Färbeintensitäten sind in Abb. 14 dargestellt.

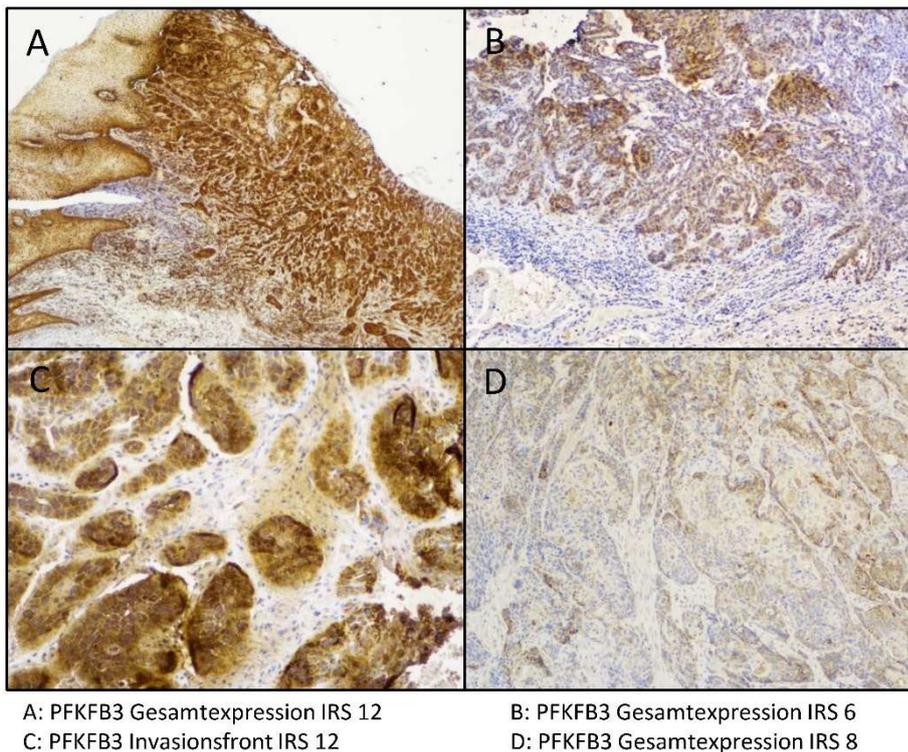


Abb. 14 Immunhistochemische Darstellung der Expression von PFKFB3. Vergrößerung 100fach.

Bei Betrachtung des gesamten gefärbten Tumorgewebes ergaben sich somit für den Gesamtscore 31 Fälle mit fehlender Expression, 12 schwach positive Fälle, 31 Fälle mit moderater Expression sowie 42 Fälle mit starker Expression. Es ergaben sich zwei Kategorien mit 43 (37,1%) negativen oder schwach positiven Fällen (low expression) und demgegenüber 73 (62,9%) Fällen mit moderater oder starker Expression (high expression).

Etwas anders präsentierten sich die Färbeintensitäten bei separater Betrachtung der Invasionsfront. Es zeigten sich dabei 18 negative Fälle, 10 schwach positive Fälle, 17 Fälle mit moderater Expression und 71 Fälle mit starker Expression. Damit ergaben sich in der Zusammenfassung 28 (24,1%) negative oder schwach positive Fälle und 88 (75,9%) Fällen mit moderater oder starker Expression.

In der multivariaten Cox-Analyse konnte kein statistisch signifikanter Unterschied für das Überleben zwischen der Gruppe von Patienten mit niedriger und hoher Gesamtexpression von PFKFB3 nachgewiesen werden (Abb. 15). Auch in der univariaten Berechnung war keine statistische Signifikanz beweisbar.

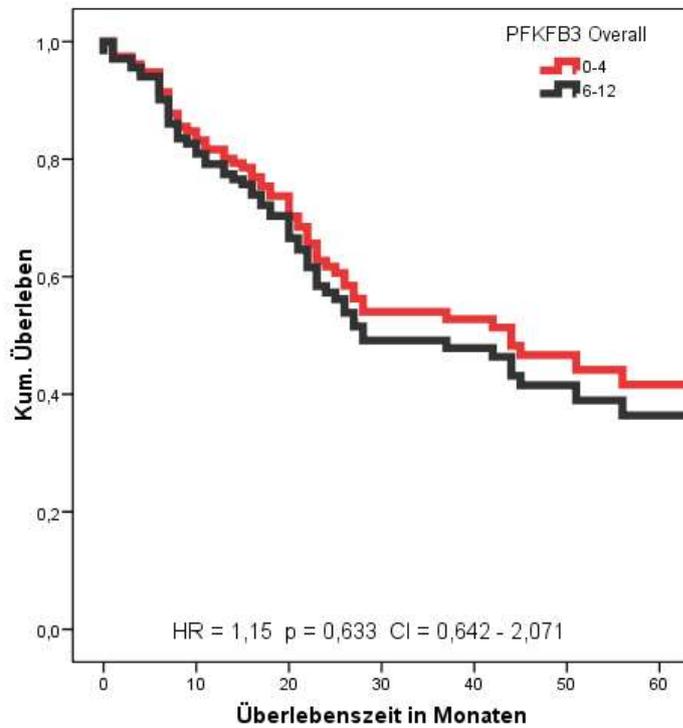


Abb. 15 Cox-Regressionsanalyse für die Intensität der Gesamtexpression von PFKFB3. Rot IRS 0-4, Schwarz IRS 6-12 (RR 1,15, $p = 0,633$)

Es erfolgte die gleiche Analyse mittels multivariater Cox-Regression für die Expression an der Invasionsfront des Tumors (Abb. 16). Auch hier konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden. Die univariate Analyse ergab ebenfalls kein statistisch signifikantes Ergebnis.

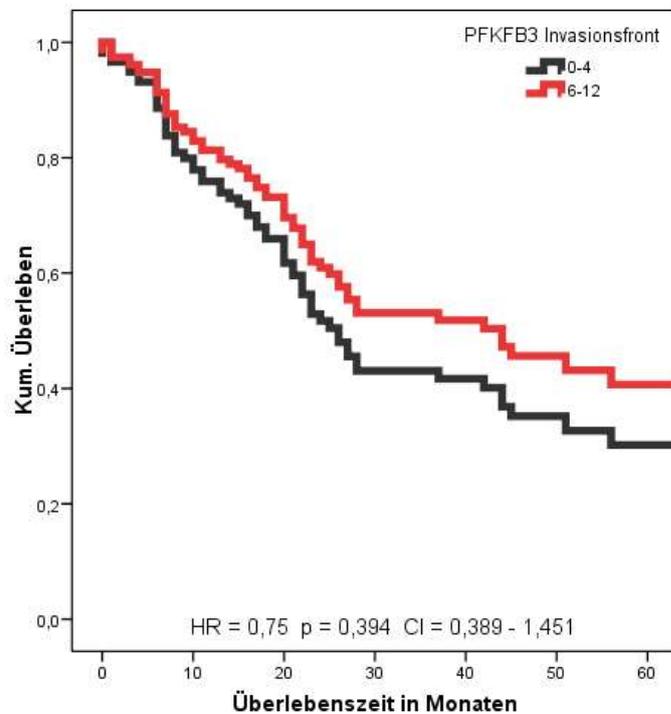


Abb. 16 Cox-Regressionsanalyse für die Intensität Expression von PFKFB3 an der Invasionsfront. Rot IRS 0-4, Schwarz IRS 6-12 (RR 0,75, $p = 0,394$)

Um die Frage zu klären, ob ein bestimmter höherer Schwellenwert existiert nach dessen Überschreitung PFKFB3 einen Einfluss auf das Überleben hat wurde eine Regruppierung vorgenommen. Da gerade an der Invasionsfront die hohe Expression (IRS ≥ 9) in über 60% der Fälle auftritt, wurde dazu ein IRS von 0-6 als niedrige Expression und ein IRS von 9-12 als hohe Expression angesehen. Dabei ergibt sich aufgrund des deutlich höheren Anteils von Fällen mit einem IRS 6 bezogen auf die Gesamttumorfläche im Vergleich zur Invasionsfront eine starke Inhomogenität der Stärke der Expression (Tab. 11).

Tab. 11 Gruppierung der PFKFB3-Expression

PFKFB3	IRS Overall	IRS Invasionsfront
Low expression (IRS 0-6)	71 (61,2%)	44 (37,9%)
High expression (IRS 9-12)	45 (38,8%)	72 (62,1%)

Es wurde nun erneut die Cox-Regressionsanalyse getrennt für Gesamttumor und Invasionsfront durchgeführt (Abb 17). In der multivariaten Berechnung zeigte sich für die Gesamtexpression eine Hazards Ratio von 1,4 für die Gruppe mit hoher Expression. Dieses Ergebnis war jedoch mit einem p-Wert von 0,177 nicht statistisch signifikant. In der univariaten Analyse (Abb. 18) zeigte sich eine Hazards Ratio von 1,6 (95% Konfidenzintervall 1,004 bis 2,662) welche statistisch signifikant war ($p = 0,048$).

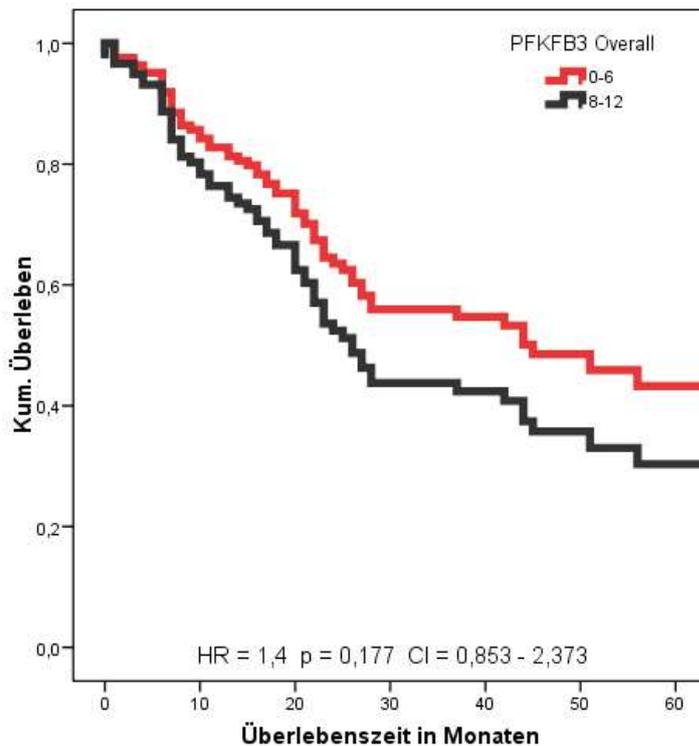


Abb. 17 Cox-Regressionsanalyse für die Intensität der Gesamtexpression von PFKFB3 (alternativer Schwellenwert). Rot IRS 0-6, Schwarz IRS 8-12 (RR 1,4, $p = 0,177$)

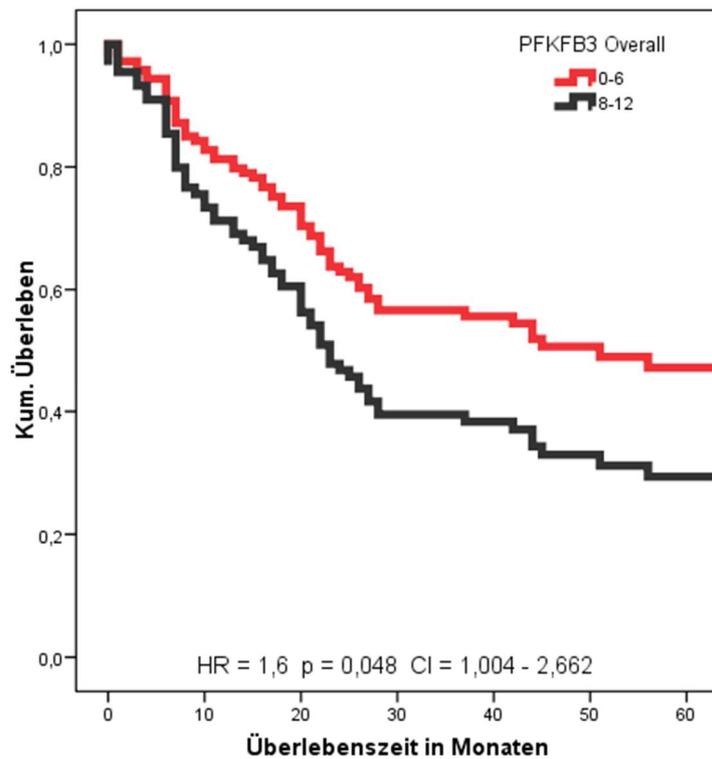


Abb. 18 Univariate Cox-Regressionsanalyse für die Intensität der Gesamtexpression von PFKFB3 (alternativer Schwellenwert). Rot IRS 0-6, Schwarz IRS 8-12 (RR 1,6, $p = 0,048$)

Die Cox-Regressionsanalyse für die Intensität der PFKFB3 an der Invasionsfront zeigte sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten (Abb. 19).

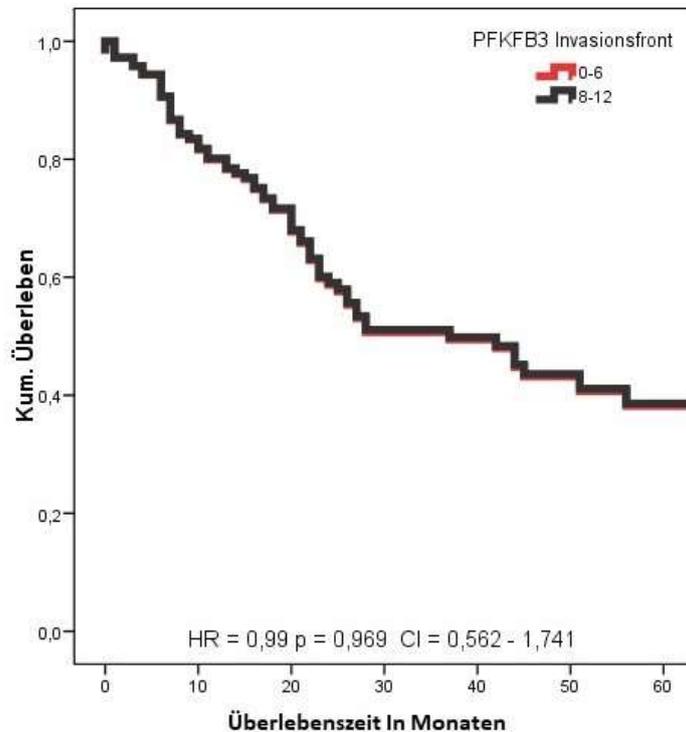


Abb. 19 Cox-Regressionsanalyse für die Intensität Expression von PFKFB3 an der Invasionsfront (alternativer Schwellenwert). Rot IRS 0-6, Schwarz IRS 8-12 (RR 0,99, $p = 0,969$)

Es wurden sowohl für HK2 als auch für PFKFB3 weitere Cox-Regressionsanalysen durchgeführt, um einen Einfluss auf das progressionsfreie Überleben zu untersuchen. Dabei konnten weder für HK2 noch für PFKFB3 signifikante Effekte auf die Dauer des progressionsfreien Überlebens nachgewiesen werden.

Zudem wurde auf eine Korrelation der Expression von HK2 und PFKFB3 mit dem Tumorstadium, dem Nodalstatus oder der Graduierung untersucht (Spearman's Rangkorrelationskoeffizient). Dabei zeigte sich eine positive, statistisch signifikante Korrelation ($r=0,184$, $p=0,048$). der Gesamtexpression von PFKFB3 mit dem Tumorstadium, was einem schwachen Effekt nach Cohen entspricht. Für die Expression von Hexokinase an der Invasionsfront und das Tumorstadium ließ sich ebenfalls eine Korrelation darstellen, das Signifikanzniveau wurde allerdings knapp verfehlt ($r=0,174$, $p=0,068$).

Es lagen aus vorherigen Untersuchungen am Paraffinmaterial des Patientenkollektivs dieser Arbeit bereits die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen für HIF1 α , Survivin, Carboanhydrase IX und GLUT1 vor (Eckert et al. 2016; Eckert et al. 2012; Eckert et al. 2010). Die eigenen

Daten wurden mit diesen Untersuchungen verglichen. Dabei korreliert die Expression von PFKFB3 an der Invasionsfront statistisch signifikant mit der Expression von HIF1 α ($r=0,203$, $p=0,029$), die Gesamtexpression korrelierte ebenfalls mit der Expression von HIF1 α ($r=0,185$, $p=0,047$).

Für Hexokinase ließ sich dagegen keine statistisch signifikante Korrelation mit HIF1 α nachweisen ($r=0,142$, $p=0,132$). Sowohl für Hexokinase als auch für PFKFB3 waren Korrelationen mit der Expression von Survivin nachweisbar. Für Hexokinase zeigte sich diese sowohl an der Invasionsfront ($r=0,229$, $p=0,17$) als auch für die Gesamtexpression ($r=0,270$, $p=0,005$). Auch für PFKFB3 war die Korrelation mit Survivin sowohl an der Invasionsfront ($r=0,252$, $p=0,08$) als auch für die Gesamtexpression ($r=0,283$, $p=0,003$) statistisch signifikant.

5. Diskussion

5.1 Patientenkollektiv und Überleben

Orale und oropharyngeale Plattenepithelkarzinome zählen zu den häufigsten Krebsarten weltweit (Listl et al. 2013). Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören Rauchen und Alkoholkonsum (Robert Koch-Institut 2015). Insgesamt erkranken mehr Männer als Frauen an OSCC oder OPSCC, was auf den unterschiedlichen Gebrauch dieser Noxen zurückgeführt wird (Blot et al. 1988; Robert Koch-Institut 2015; Robert Koch-Institut 2017). Auch in dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv überwog der Anteil der Männer deutlich (78% vs. 22%). Bei Frauen hat die Inzidenz dieser Krebserkrankung allerdings geringfügig zugenommen. Das sich dieses im Rahmen dieser Arbeit nicht widerspiegelt, kann zum Teil der Tatsache geschuldet sein, dass die Tumoren bei Männern häufig in höheren Stadien entdeckt werden (s.u.) und die fortgeschrittenen Stadien dieser Erkrankung im Krankengut einer Universitätsklinik überrepräsentiert sind (Robert Koch-Institut 2017).

Das Robert-Koch-Institut gibt das Erkrankungsalter für Männer mit 63 und für Frauen mit 66 Jahren an (Robert Koch-Institut 2017). Die eigenen Daten von 57,4 Jahren für Männer und 63 Jahren für Frauen bestätigen das spätere Erkrankungsalter von Frauen, zu dem möglicherweise auch Unterschiede in Tabak- und Alkoholkonsum beitragen.

Bei OSCC und OPSCC werden bei Frauen häufiger frühe Tumoren des Stadiums T1 und T2 gefunden als bei Männern (Robert Koch-Institut 2015). Auch in den vorliegenden Daten war dieser Trend zu erkennen. So traten Tumoren des Stadium T1 und T2 bei 61,6% der Frauen, aber nur bei 45,5% der Männer auf.

Die Fünfjahresüberlebensrate wird in der Studie von Listl et al. für Patienten mit OSCC in Deutschland altersstandardisiert mit 54,6% angegeben (Listl et al. 2013). In einer anderen Arbeit aus der Universitätsklinik Halle in der Tumoren aus den Jahren 1993 bis 1998 untersucht worden waren, wurde eine Überlebensrate von 57,3 % gefunden (Eckert et al. 2010; Lautner 2008; Eckert 2008). Die Daten decken sich weitgehend mit denen anderer Industrienationen, während Schwellen- und Entwicklungsländer erwartungsgemäß deutlich schlechtere Überlebensraten aufweisen. So geben Pontes et al. in einer Studie zu OSCC im Amazonasgebiet eine Fünfjahresüberlebensrate von 27% an. (Pontes et al. 2011). Das National Health Institute der USA gibt im SEER Cancer Statistics Review eine Fünfjahresüberlebensrate von 64,5 % an. Hier unterscheiden sich die Prognosen der ethnischen Gruppen jedoch beträchtlich (65,0% bei Weißen und 48% bei Schwarzen) (Howlader et al. April 2017). Das Robert Koch Institut gibt in den Daten von 2011 und 2012 die Fünfjahresüberlebensrate der Karzinome von Mundhöhle und Rachen für Frauen mit 55%, für Männer mit 43% an. Diese

ungünstigere Überlebensrate für Männer deckt sich mit den Daten von Listl et al. (61,3 vs. 53%) und mit den Daten des National Cancer Institutes der USA (63,9% vs. 68,9%) (Howlader et al. April 2017). Im Gegensatz dazu betrug die Fünfjahresüberlebensrate der Patienten in dieser Arbeit 40%, wobei interessanterweise die der Frauen bei 34% lag, die der Männer hingegen 45% betrug. Dazu lassen sich eine Reihe von Ursachen diskutieren: Es ist zu bemerken, dass das Robert Koch Institut den prozentualen Anteil von T3- und T4-Tumoren mit 44% für Männer und 35% für Frauen angibt (Robert Koch-Institut 2015). Auch in der bereits zitierten Arbeit von Lautner fanden sich in der überwiegenden Anzahl (60%) T1 und T2-Tumoren (Lautner 2008). In der hier vorliegenden Arbeit sind die fortgeschrittenen Tumoren bei Männern mit 54,5 % deutlich und bei Frauen mit 38,4% etwas überrepräsentiert. Diese Tatsache könnte eine Erklärung für die schlechte Fünfjahresüberlebensrate in diesem Patientenkollektiv sein. Zudem ist in den Daten des National Cancer Institutes für 32% der Patienten eine zum Zeitpunkt der Diagnose lokalisierte Erkrankung, für 44% eine fortgeschrittene Erkrankung mit regionären lymphonodalen Karzinometastasen beschrieben (Howlader et al. April 2017). Demgegenüber hatten in unserer Untersuchung 54,3% der Patienten bereits lymphonodale Metastasen. Also ist das Stadium der Tumorerkrankung in der vorliegenden Untersuchung fortgeschritten und damit negativ selektiert, was für Universitätsklinika typisch ist. Die Häufigkeit von Fernmetastasen war allerdings deutlich geringer als in den Daten des National Cancer Institutes (3,4% vs. 19%).

Darüber hinaus ist zu bemerken, dass in den Daten des Robert-Koch-Instituts, wie nach ICD üblich, zu den Tumoren von Mundhöhle und Rachen auch die Karzinome der Lippe gezählt werden. Diese Tumoren haben eine deutlich günstigere Prognose, möglicherweise weil eine Detektion der Veränderungen aufgrund der besseren Sichtbarkeit in früheren Stadien gelingt (Molnár et al. 1974; Cerezo et al. 1993). Diese zusammenfassende Betrachtung ist aus klinisch-pathologischer Sicht problematisch, da die Lippe, anders als die übrigen Strukturen von Mundhöhle und Oropharynx, von verhornendem und nicht-verhornendem Plattenepithel bedeckt ist und so eine Übergangszone darstellt, in der andere Bedingungen herrschen als in Mundhöhle und Oropharynx. Einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines Karzinoms der (Unter-)Lippe ist die chronisch-aktinische Schädigung, was einen weiteren deutlichen Unterschied zu Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinomen darstellt (Batista et al. 2010). Offenbar bestehen auch Unterschiede im Tumormikromilieu, beispielsweise in der Lymphozytenpopulation des entzündlichen Infiltrats (Zancope et al. 2010). Es handelt sich hier also um eine eigene Entität, deren Karzinogenese deutliche Unterschiede zu den OSCC und OPSCC aufweist. Aus diesen Erwägungen wurden in der vorliegenden Untersuchung keine Patienten mit Karzinomen der Lippe eingeschlossen, die mit ihrer deutlich günstigeren Prognose für eine insgesamt bessere Fünfjahresüberlebensrate gesorgt hätten.

Das Fehlen oder Vorhandensein von lokoregionären lymphonodalen Metastasen hat einen deutlichen Einfluss auf die Prognose von Patienten mit OSCC und OPSCC. So fand Listl in seiner Untersuchung bei Patienten mit OSCC eine Verschlechterung der Fünfjahresüberlebensrate von 70,9% auf 37,2% beim Vorhandensein von lokoregionären Metastasen. Auch Sklenicka fand einen signifikanten Einfluss des Nodalstatus auf die Überlebenszeit (Sklenicka et al. 2010). Interessanterweise zeigen die Daten des National Health Institutes zwar ebenfalls eine Verschlechterung des Trends, trotzdem ist die Prognose in der dort untersuchten Patientengruppe deutlich günstiger (83,7% vs. 74,2%) (Howlander et al. April 2017). Auch in den eigenen Ergebnissen zeigte sich der prognostische Einfluss einer lokoregionären Metastasierung. Es fand sich eine Fünfjahresüberlebensrate von 22% bei Patienten mit lymphonodalen Metastasen, bei lokalisierter Erkrankung betrug sie hingegen 44 %. Somit ist aus klinischer Sicht der Status der lymphonodalen Metastasierung der wichtigste prognostische Parameter.

5.2 Hexokinase 2-Expression in OSCC und OPSCC

HK2 ist eine Isoform der Hexokinase, welche die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat und somit den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse katalysiert und wird somit ganz gezielt als Schlüsselenzym der Glykolyse betrachtet (Ahn et al. 2009). Nur diese Isoform der Hexokinase ist in Tumoren überexprimiert (Wu et al. 2017). Für zahlreiche Tumore wurde bereits eine deutlich erhöhte Expression von HK2 beschrieben. Bei Patientinnen mit zerebralen Mammakarzinometastasen waren hohe HK2-Expressionen mit einer schlechteren Prognose ($p = 0,028$) assoziiert (Palmieri et al. 2009). Auch in Larynxkarzinomen und hepatozellulären Karzinomen wurde eine HK2-Überexpression beschrieben (Chen et al. 2014; Lee et al. 2016). In Kolonkarzinomen wurde für eine hohe HK2-Expression an der Invasionsfront eine Assoziation mit höheren Tumorstadien ($p = 0,0395$) und dem Vorhandensein von lymphonodalen Metastasen beschrieben ($p = 0,0409$), auch das rezidivfreie Überleben war bei Patienten mit diesen Tumoren kürzer (Hamabe et al. 2014).

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde die zytoplasmatische Expression von HK2 mittels des IRS nach Remmele quantifiziert und dabei die Gesamtexpression und die Expression an der Tumorfront getrennt ausgewertet. Es wurden Gruppen mit jeweils hoher und niedriger Expression identifiziert. In der multivariaten Cox-Analyse zeigten dabei die Patienten mit hoher Gesamtexpression von HK2 im Vergleich zu denen mit niedriger Gesamtexpression eine schlechtere Prognose (HR = 1,8, $p = 0,038$). Die hohe Expression von HK2 an der Invasionsfront war mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert (HR = 2,8, $p = 0,012$). Somit konnte HK2 als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt werden. Liu et al. beschrieben in einer Metaanalyse, dass eine erhöhte Expression von HK2 mit einem schlechteren Gesamtüberleben von Patienten mit hepatozellulären Karzinomen (HR = 2.06, $p < 0.001$), kolorektalen Karzinomen (HR = 2.89, $p < 0.001$) und Magenkarzinomen (HR = 1.72, $p =$

0.020) assoziiert ist, für das Pankreaskarzinom konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht beschrieben werden (Liu et al. 2016). In einer anderen Metaanalyse kamen Wu et al. bei Untersuchungen von soliden gastrointestinalen Tumoren (hepatozelluläre Karzinome HR = 1.87, $p < 0.001$ und kolorektale Karzinome HR = 2.89, $p < 0.001$) zu ähnlichen Ergebnissen (Wu et al. 2017). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich mit diesen Analysen.

Eine hohe Expression an der Invasionsfront zeigte eine deutlichere Zunahme des Risikos eines Versterbens. Möglicherweise ist dieser Effekt auf das spezielle Tumormikromilieu an der Invasionsfront und der Heterogenität von pH-Wert, Oxygenierung und hydrostatischen Verhältnissen zurückzuführen, die aufgrund einer ungleichmäßigen Neovaskularisation vorliegen könnten (Milosevic et al. 2004; Kim et al. 2007). Da die Aktivität der Hexokinase der wesentliche geschwindigkeitsbestimmendes Schritt der Glykolyse ist und die HK2 unter hypoxischen Bedingungen deutlich wichtiger als die HK1 erscheint, würde sich somit ihre hohe Aktivität in diesem Mikromilieu erklären (Mathupala et al. 1995). Daneben könnte auch ein zweiter Mechanismus eine wichtige Rolle bezüglich des adversen prognostischen Effektes spielen: Die Lokalisation von HK2 an der äußeren mitochondrialen Membran verhindert die Bildung mitochondrialer Permeabilitäts-Transitions-Poren und verhindert so die Apoptose (Chiara et al. 2008). Interessanterweise zeigt sich der Unterschied in der Expression am deutlichsten etwa ab 2 Jahren nach der primären Operation. Die hohe Expression vom HK2 könnte demnach mit einer Metastasierung assoziiert sein. Diesen Zusammenhang konnten Wang et al. bei Karzinomen der Zunge zeigen. Hierbei war eine hohe Expression von HK2 mit einer erhöhten Aktivität von SOD2 (Superoxid dismutase 2) und einer dadurch gesteigerten intrazellulären Konzentration von H_2O_2 verbunden, welche Migration und Invasion der Karzinomzellen begünstigt (Han et al. 2017; Wang et al. 2017). Auch für Neuroblastome konnte der Zusammenhang zwischen HK2-Aktivität und Metastasenbildung gezeigt werden (Botzer et al. 2016). Darüber hinaus könnte eine hohe Expression von HK2 mit einer vermehrten Rezidivbildung assoziiert sein., es konnte in diesem Zusammenhang für Pankreaskarzinome eine höhere Rate von Lokalrezidiven bei HK2-überexprimierenden Tumoren gefunden werden (Ogawa et al. 2015). Auch für Patienten mit Kolonkarzinom konnte ein Zusammenhang zwischen Rezidiven und HK2-Überexpression gezeigt werden (Hamabe et al. 2014).

Zusammenfassend könnte die hohe Expression von HK2 demnach über die Nutzung des Warburg-Effektes einen Überlebensvorteil für die Tumorzelle bilden, die sich über diese metabolische Plastizität an das nährstoffarme Tumormikromilieu anpassen kann. Therapeutische Maßnahmen können zu weiterer Knappheit an Substraten führen, so dass nur Zellen die über eine hohe HK2-Expression in dieser Nische überleben können, später zu Metastasen- und Rezidivbildung beitragen werden können. Über die wichtigen tumorbiologischen Effekte durch die HK2 zum Überleben der Tumorzelle beiträgt, spielt es somit eine kritische Rolle bei Tumorwachstum und Progression. Gleichzeitig konnte gezeigt

werden, dass in verschiedenen soliden Tumoren die Expression von HK2 auch eine prognostische Aussage erlaubt (Liu et al. 2016). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diesen Zusammenhang nun auch für das OSCC und OPSCC.

5.3 PFKFB3-Expression in OSCC und OPSCC

PFKFB3 katalysiert als bidirektionales Enzym einerseits in Form der Phosphofruktokinase-2 die Bildung von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-2,6-Bisphosphat und andererseits als Fruktose-2,6-bisphosphatase die Bildung von Fruktose-2,6-Bisphosphat zu Fruktose-6-Phosphat (Denko 2008). Seine Kinaseaktivität ist dabei jedoch um 700fach höher als die Bisphosphataseaktivität (Yalcin et al. 2014). Die Expression von PFKFB3 konnte in zahlreichen Tumorentitäten nachgewiesen werden und wird über HIF 1 reguliert (Obach et al. 2004; Navarro-Sabaté et al. 2001; Ghesquière et al. 2014). So fanden Atsumi et al. eine Überexpression in kolorektalen Karzinomen, Mammakarzinomen und Adenokarzinomen der Prostata, ohne dass hier jedoch Aussagen zu Überlebensraten getroffen wurden (Atsumi et al. 2002).

In der Untersuchung der immunhistochemischen Gesamtexpression und der Expression an der Invasionsfront des hier vorliegenden Patientenkollektivs mit OSCC und OPSCC fanden sich zwei Gruppen mit niedriger und hoher Expression von PFKFB3. Dabei ergab sich in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für die Gesamtexpression eine Tendenz zu einer schlechteren Prognose für die Gruppe mit hoher Gesamtexpression von PFKFB3, wenn gleich die statistische Signifikanz nicht erreicht werden konnte (HR = 1,4, p = 0,177). Betrachtet man die Gesamtexpression ohne Adjustierung für zusätzliche Faktoren, konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Prognose gezeigt werden (HR = 1,6, p = 0,048). Für die Invasionsfront ergab sich kein Zusammenhang einer hohen Expression mit einer schlechteren Prognose, bisher finden sich hierzu auch keine veröffentlichten Untersuchungen. Somit ist die vorliegende Untersuchung die erste, die diesen fehlenden Zusammenhang nachgewiesen hat. Nichtsdestotrotz konnte die Rolle von PFKFB3 bei der Regulation der Glykolyse und dem Wachstum von Tumorzellen bereits mehrfach nachgewiesen werden. So wiesen Minchenko et al. die Expression von PFKFB3 in Pankreas- und Magenkarzinomzelllinien nach und beschrieben auch eine Korrelation mit der Expression von VEGF, Glut-1 mRNA und Hif1 α (Minchenko et al. 2014).

Han et al. untersuchten die Expression von PFKFB3 in Magenkarzinome und fanden eine Korrelation mit Tumorstadium und Nodalstatus. Bezüglich der Prognose wurde keine Aussage getroffen (Han et al. 2017). In AML-Zelllinien konnte durch Feng et al. gezeigt werden, dass eine mTOR-abhängige Aktivierung von PFKFB3 für das Überleben der AML-Zellen notwendig ist (Feng und Wu 2017). Immer wieder wurde PFKFB3 auch als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt diskutiert. Feng und

Mitarbeiter beschrieben, dass die Behandlung der AML-Zelllinien mit Rapamycin zu einer verminderten Expression von PFKFB3 führte. Eine zusätzliche Behandlung mit dem PFKFB3-Inhibitor PFK15 zeigte dabei einen synergistischen Effekt (Feng und Wu 2017). Cantelmo et al. untersuchten eine pharmakologische Blockade von PFKFB3 in Endothelzellen im Mausmodell und konnten zeigen, dass diese zu einer verbesserten Chemosensitivität führte (Cantelmo et al. 2016).

Zu den Ursachen für einen fehlenden Zusammenhang der PFKFB3-Expression mit der Prognose könnte möglicherweise zählen, dass diese Isoform beim OSCC und OPSCC eine weniger wichtige Rolle spielt. Durch die Aktivität der PFKFB versucht die Tumorzelle der Hemmung der PFK1 zu entgehen und trotz hohem ATP-Level weiter Glukose abzubauen, um Pyruvat für andere Stoffwechselprozesse zu generieren (Yalcin et al. 2009). Da die PFKFB3 die höchste Kinase-Aktivität aller vier Isoformen hat, liegt es nahe anzunehmen, dass sie eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Rate der Glykolyse spielt (Chesney 2006). Auch die anderen Isoformen der PFKFB werden durch über HIF 1 reguliert. Möglicherweise spielen diese anderen Isoformen eine wichtigere Rolle als angenommen, so dass ihre Expression und ihr Einfluss auf die Prognose von Patienten mit OSCC und OPSCC in Zukunft in weiteren Untersuchungen geklärt werden muss.

Es ist zudem bekannt, dass PFKFB3 einer posttranslationalen Modifikation unterliegt (Ros und Schulze 2013). Es konnte in kolorektalen und Mammkarzinomen eine Phosphorylierung in der Position Ser461 gezeigt werden. Diese Konformationsänderung spricht für eine erhöhte PFK-2 Aktivität in diesen Tumoren (Bando et al. 2005). Zudem existieren unterschiedliche Splicevarianten der PFKFB3 in Form einer ubiquitären PFK (uPFK2) und einer induzierbaren PFK (iPFK2) (Ros und Schulze 2013). Möglicherweise ist die Enzymbiologie so komplex, dass der PFKFB3-Status doch nicht zu prognostischen Zwecken herangezogen werden kann. Interessanterweise zeigten lediglich 51 Fälle (44%) gleichzeitig eine hohe HK2- und PFKFB3-Gesamtexpression, wobei eine besonders schlechte Prognose bei Koexpression nicht nachgewiesen werden konnte.

Dass die Expression von PFKFB3 bei OSCC und OPSCC dennoch von großem Interesse ist, zeigen Arbeiten mit Interesse an der therapeutischen Option, die eine Inhibition des Enzyms bietet. Es konnte gezeigt werden, dass intratumorale endotheliale Zellen einer starken Glykolyse unterliegen und PFKFB3 hier überexprimiert wird (Ghesquière et al. 2014). Über eine Hemmung von PFKFB3 im Maus-Modell mittels 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO/PFK15) konnte die Angiogenese normalisiert, das metastatische Potential herabgesetzt und die Sensitivität für Chemotherapeutika gesteigert werden (Cantelmo et al. 2016; Cantelmo et al. 2016). Li, Yang und Mitarbeiter bestätigten diese Ergebnisse in einem Mausmodell mit Cal27 transfizierten Mäusen, die HNSCC entwickelten. Auch hier konnte durch die Behandlung mit PFK15/3PO das Tumorwachstum und die Tumorzellmigration und -invasion signifikant gehemmt werden (Li et al. 2017). Ähnliche Ergebnisse liegen für Rhabdomyosarkomzelllinien vor (Wang et al. 2018).

Möglicherweise liegt die perspektivische Bedeutung von PFKFB3 gerade in seiner Beeinflussbarkeit durch pharmakologische Interventionen. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig um die therapeutische und prognostische Signifikanz von PFKFB3 umfassender verstehen zu können.

5.4 HIF1 und sein Einfluss auf den Metabolismus der Tumorzelle

HIF1 α spielt sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen eine zentrale Rolle in der Karzinogenese, wobei sowohl upstream als auch downstream gelegene Mechanismen wichtig sind. Neben den metabolischen Besonderheiten der Tumorzelle spielt auch die direkte Aktivierung durch Onkogene bzw. Loss-of-function-Mutationen von Protoonkogenen eine wichtige Rolle (Semenza 2010). Über die Transkription von HK2 wird mit Hexokinase das erste Enzym der Glykolyse aktiviert (Iyer et al. 1998). Ein weiterer wichtiger Mechanismus der von HIF1 vermittelt wird, ist die pH-Homöostase, da das Tumormikromilieu mit seinem speziellen Metabolismus eine hohe azidotische Last aufweist und mittels verschiedener Systeme den intrazellulären pH-Wert aufrecht erhält (Chiche et al. 2010). Dabei sind neben dem durch den hohen glykolytischen Fluss anfallenden Laktat auch die CO₂-Produktion durch die Zelle und die dadurch resultierende Hyperkapnie für die entstehende Azidose verantwortlich. HIF1 reguliert wichtige Enzyme der pH-Homöostase, darunter MCT, Carboanhydrasen (besonders CA IX) sowie Na⁺/HCO₃⁻ Kotransporter (NHE) (Parks et al. 2017). Dabei ist besonders auf eine Arbeit aus der Universitätsklinik Halle zu verweisen, welche die prognostische Relevanz von CA9 mRNA und CA IX beim OSCC untersucht und CA9/CA IX als unabhängigen prognostischen Marker beschreibt (Eckert et al. 2019).

Darüber hinaus bestehen über HIF1 Verbindungen zum Aminosäurestoffwechsel allgemein und zur Glutaminolyse im speziellen. Essentielle Aminosäuren sind notwendige Bausteine für die Proteinsynthese, welche von den Zellen nicht selbst synthetisiert werden können (Parks et al. 2017), zudem ist die Aktivierung von mTOR an eine stabile intrazelluläre Leuzinkonzentration gebunden (Wolfson et al. 2016). Essentielle Aminosäuren können nicht frei diffundieren, sondern benötigen Transportproteine, um die Zellmembran zu überwinden. Der natriumabhängige Large-Type Aminosäuretransporter 1 (LAT1/SCL7A5) ist zur Aufnahme essentieller Aminosäuren mit konsekutiver Abgabe von Glutamin fähig und in zahlreichen Karzinomen überexprimiert (Verrey et al. 2004; Parks et al. 2017). Der ASCT-type-2 Aminosäuretransporter 2 (ASCT2/SLC1A5) ist ebenfalls natriumabhängig und ist für die Aufnahme kleiner Aminosäuren, unter anderem auch Glutamin, zuständig (Bröer et al. 2000). Toyoda und Mitarbeiter beschrieben die Überexpression von LAT1 und ASCT2 ist als adverser prognostischer Faktor beim Zungenkarzinom (Toyoda et al. 2014). Wie bereits beschrieben dient Glutamin der Tumorzelle als Quelle für Stickstoff und Kohlenstoffgrundgerüsten für anabole Prozesse (Dang 2010b; Dang 2010a; Kappler et al. 2017). HIF1 scheint auch hier eine

herausragende Rolle für die intrazelluläre Verwertung des Glutamins zu spielen. So wird die reduktive Carboxylierung von Glutamin über HIF1 vermittelt. Dies ist ein notwendiger Schritt um Zitrat, das im Rahmen der Glykolyse bei Hypoxie nicht mehr ausreichend zu Verfügung steht, für die Fettsäuresynthese zu generieren (Semenza 2013). Auch für die Glutaminolyse scheint dabei zu gelten, dass HIF1 auch unter Normoxie seine Wirkung entfalten kann, was von Kappler et al. gezeigt werden konnte (Kappler et al. 2017). Da im Rahmen der Glutaminolyse Ammonium entsteht, sinkt der intrazelluläre pH-Wert. In diesem sauren Milieu kann HIF1 α nicht durch Prolyl-Hydroxylase-Domain-Proteine (PHD) hydroxyliert werden und entgeht damit dem weiteren proteasomalen Abbau (Chiche et al. 2010). Somit scheint das azidotische Milieu die entscheidende Voraussetzung für die Aktivität von HIF1 zu sein. Darüber könnte auch zu erklären sein, daß HIF1 α sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen aktiviert wird (Kappler et al. 2017). Zudem konnte von Kappler et al. gezeigt werden, dass durch glutamin-induzierte Aktivität von normoxisch aktiviertem HIF1 die Expression von sechs für die Glykolyse relevante Gene heraufreguliert wird, darunter auch HK2 (Kappler et al. 2019).

Der Einfluss anderer wichtiger onkogenetischer pathways unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen auf HIF1 α wird zunehmend auch im speziellen Hinblick auf HNSCC untersucht.

So beschreiben Bocca et al. dass die Hemmung der COX2 durch NS398 unter Normoxie zur Reduktion der von EGF induzierten pathways wie PI3/AKT und ERKs führt, unter hypoxischen Bedingungen jedoch EGF Stimulation und eine HIF1 α Expression resultierten (Bocca et al. 2014). Bereits Wheeler et al. untersuchten den Einfluss der EGFR Variante III (EGFRvIII) auf Invasion und Migration beim HNSCC. Sie konnten zeigen, dass die EGFRvIII-induzierte Aktivierung von STAT3 zu einer Induktion von HIF-1 α führte. Dieser Effekt konnte im Unterschied zu den Tumorzellen, welche den EGFR-Wildtyp exprimierten, durch Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab nicht gehemmt werden (Wheeler et al. 2010). Wang und Mitarbeiter fanden eine über HIF1 α und Notch1 medierte Reduktion der Neoangiogenese nach Inhibition von EGFR (Wang et al. 2015). Dass die Aktivierung von EGFR auch in OSCC zu der erhöhten Glykolyse des Warburg-Effektes beiträgt und dass dieser die Epitheliale-mesenchymale Transition induziert sowie den Tumorzellen Stammzelleigenschaften verleiht, konnte von Xu et al. gezeigt werden (Xu et al. 2017). Darüber hinaus zeigten Zhang und Mitarbeiter, dass in Prostatakarzinomzelllinien die Aktivierung von EGFR zu einer Expression der HK2 führt, ein Effekt der auch bei HNSCC möglich erscheint (Zhang et al. 2017).

Auch der JAK/STAT-Pathway steht in Verbindung mit HIF1 α . Im Mausmodell und in HNSCC Gewebeproben konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von JAK2/STAT3 zu einem sinkenden HIF1 α -Level führt (Liu et al. 2018).

Ebenso haben die eingangs erwähnten MicroRNAs Einfluss auf die Glykolyse und unterliegen teilweise der Kontrolle durch HIF1. So ist miR-210 eine Hypoxie-assoziierte MicroRNA und wird durch HIF1 α

verstärkt induziert (Kulshreshtha et al. 2007). Für Pankreaskarzinome und Weichteilsarkome konnte hier ein Zusammenhang mit einem schlechteren Überleben gezeigt werden (Greither et al. 2012; Greither et al. 2010). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte HK2 ist eine Zielstruktur der MicroRNA miR-125b-5p und wird durch diese herunterreguliert. Hui et al. konnten für in Larynxkarzinomen eine deutliche Verminderung der miR-125b-5p zeigen, welche mit Tumorstadium, Differenzierung und Metastasierung assoziiert war (Hui et al. 2018). Ähnliche Effekte zeigten Zhang und Mitarbeiter für miR-145 beim Ovarialkarzinom (Zhang et al. 2018a). Auch eine Aktivierung der Glykolyse in Tumorzellen durch MicroRNAs wird beschrieben. So finden Zhang et al. in Tumorzelllinien nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome eine Abhängigkeit des PTEN-Akt-mTOR-pathways über die direkte Interaktion von miR-214 mit PTEN. Die Herunterregulation von miR-124 hemmte die Zellproliferation und die Glykolyse über eine verminderte HK2- und PKM2-Expression (Zhang et al. 2018b).

Der HPV-Status scheint ebenfalls eine Rolle auf den Metabolismus von Tumorzellen zu haben. So konnte von Jung et al. gezeigt werden, dass HPV-negative oropharyngeale Tumorzellen HIF1 α und die dadurch regulierten Glykolyseenzyme wie HK2 und CA IX in höherem Maße exprimieren als HPV-positive, die ihrerseits eine höhere COX-Expression aufwiesen. Auch die PDK-Expression war bei den HPV-negativen Tumorzellen höher (Jung et al. 2017). Erneut sei hier jedoch auf die Arbeit von Götz et al. hingewiesen, die bei OSCC nur in 5% HPV-positive Tumore fanden (Götz et al. 2016).

Die eigenen Untersuchungen zeigen in der Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Autoren, dass HIF1-abhängige metabolische Veränderungen in der Tumorzelle eine herausragende Rolle spielen. Dabei rückt zunehmend auch die Aktivierung von HIF1 unter Normoxie in den Fokus, wobei hier noch nicht alle Mechanismen ausreichend verstanden werden (Kappler et al. 2017). Vor allem HK2 liefert darüber hinaus prognostisch verlässliche additive Angaben und ist in der klinischen Routine einfach beurteilbar.

Letztlich kann auf der Basis der eigenen Untersuchungen zur Glykolyse unter Berücksichtigung des wichtigen Steuerungsproteins HIF1 α folgende metabolische Situation in der Tumorzelle formuliert werden:

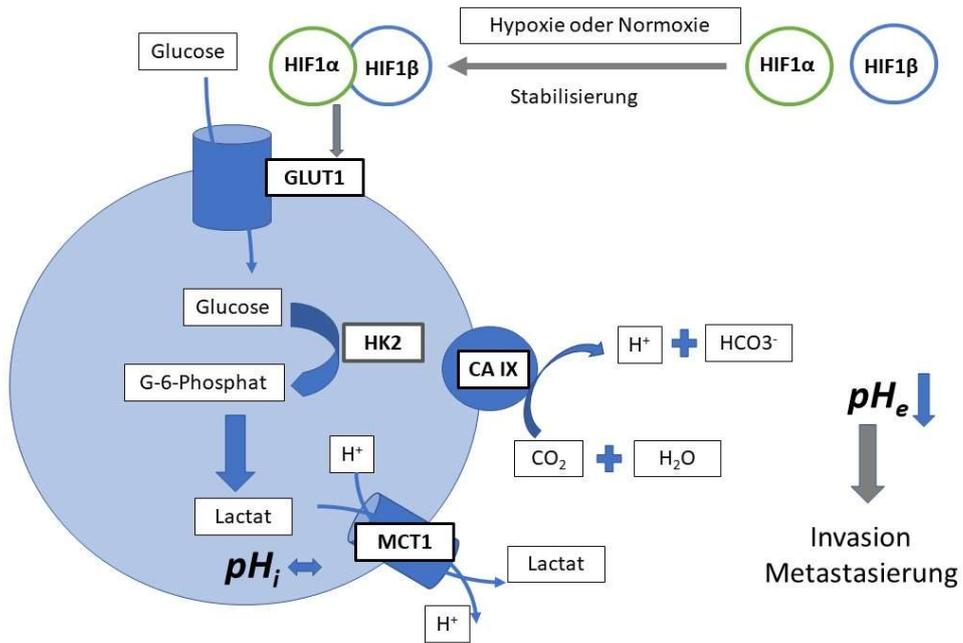


Abbildung 20 Einfluss von HK2 auf Glukosemetabolismus der Tumorzelle und Tumormikromilieu in Abhängigkeit von der Aktivierung via HIF1α. **MCT1** Monocarboxylt-Transporter 1 **CA IX** Carboanhydrase IX **GLUT1** Glukosetransporter 1. Vereinfachte Darstellung ohne Zwischenschritte der Glykolyse.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Orale und oropharyngeale Plattenepithelkarzinome stellen unter den Tumoren der Kopf-Hals-Region mit 90% den Hauptanteil dar und machen weltweit bei Männern 5% und bei Frauen 2% aller Krebserkrankungen aus, wobei die Inzidenz bei Frauen in der letzten Zeit zugenommen hat. Diese Entität zählt somit zu den 10 häufigsten bösartigen Tumoren des Menschen. Die Hauptrisikofaktoren für OSCC und OPSCC sind Alkohol- und Nikotinabusus, wobei für einen Teil der OPSCC auch die Infektion mit HR-HPV eine Rolle spielt. Bisher ist es nicht gelungen, eine wesentliche Verbesserung der Überlebensrate für Patienten mit OSCC und OPSCC zu erreichen.

Da die klassischen histologischen Parameter, die zur Stadieneinteilung der Tumoren nach der TNM-Klassifikation herangezogen werden, genauso wie die Graduierung für eine individuelle Prognoseabschätzung bisher als nicht ausreichend erscheinen, gibt es seit längerer Zeit Bestrebungen, zusätzliche molekulare Marker zu identifizieren, die sich hierfür als Surrogatparameter eignen. Dabei ist eine immunhistochemische Bestimmung dieser Marker als kostengünstige und einfache Methode wünschenswert. Interessant sind hier auf der neben den klassischen Signalkaskaden in zunehmendem Maße auch Enzyme, die wesentlich am Tumormetabolismus beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde am paraffineingebetteten Tumormaterial von 116 Patienten der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie in einer multifaktoriellen Analyse die immunhistochemische Expression von zwei wichtigen Enzymen der Glykolyse untersucht. Die Glykolyse spielt im Rahmen des Warburg-Effektes eine bedeutende Rolle zur Deckung des Energie- und Substratbedarfs einer sich teilenden Tumorzelle. Hexokinase 2 ist dabei das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykolyse und ist daher von ausschlaggebender Bedeutung für den Glukoseumsatz der Tumorzelle. PFKFB3 ist eine Isoform eines bifunktionalen Enzyms, das als Phosphofruktokinase 2 (PFK2) die Bildung von Fruktose-2,6-Bisphosphat zu Fruktose-6-Phosphat katalysiert. Es unterliegt nicht der Hemmung durch ATP. Da PFKFB3 zudem auch die höchste Kinaseaktivität aller Isoformen der PFK2 zeigt, ist für PFKFB3 ebenfalls eine zentrale Bedeutung für die Glykolyse zu vermuten.

Eine starke Expression von HK2 konnte als unabhängiger statistisch signifikanter prognostischer Marker identifiziert werden. Insbesondere im Bereich der Invasionsfront war die Expression von HK2 mit einer 2,8-fach schlechteren Prognose assoziiert. Dieses Ergebnis bestätigt die in Untersuchungen für andere Tumorentitäten beschriebene prognostische Relevanz einer erhöhten Expression von HK2. Für PFKFB3 konnte nur in der univariaten Analyse ein signifikanter Einfluss auf das Überleben gezeigt werden. Ein Nutzen als unabhängiger Marker zur Prognoseabschätzung konnte somit nicht bewiesen werden.

Für die Zukunft sollten die gefundenen Ergebnisse nun in breiter angelegten Untersuchungen verifiziert werden, um für eine Anwendung zur Therapiestratifizierung herangezogen werden zu können. Darüber hinaus ist es perspektivisch von großem Interesse, in welcher Weise die weiteren

Isoformen von PFKFB beim Plattenepithelkarzinom von Mundhöhle und Oropharynx eine wichtigere Rolle als PFKFB3 spielen und ebenfalls für therapeutische und prognostische Einschätzungen herangezogen werden können.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann festgestellt werden, dass zumindest HK2 – in Ergänzung zum Expressionsmuster von HIF1 α und GLUT1 – das sogenannte Markerpanel zur Charakterisierung der Aggressivität von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle ergänzen sollte. Möglicherweise gelingt es in Zukunft unter Berücksichtigung weiterer Schlüsselproteine des Warburg-Effektes und der Glykolyse, noch verlässlichere Aussagen zur Aggressivität des Mundhöhlenkarzinoms treffen zu können.

7. Literatur

- Agaimy A, Weichert W (2016) Grading von Tumoren der Kopf-Hals-Region. *Pathologie* 37:285–292. doi:10.1007/s00292-016-0173-9
- Ahn KJ, Kim J, Yun M, Park JH, Lee JD (2009) Enzymatic properties of the N- and C-terminal halves of human hexokinase II. *BMB Rep* 42:350–355
- Ansary-Moghaddam A, Huxley RR, Lam TH, Woodward M (2009) The risk of upper aero digestive tract cancer associated with smoking, with and without concurrent alcohol consumption. *Mt Sinai J Med* 76:392–403. doi:10.1002/msj.20125
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (2012) S 3-Leitlinie: Mundhöhlenkarzinom "Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms". http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/S3-Mundhoehlenkarzinom-OL-Langversion_.pdf. Zugegriffen: 22. Januar 2020
- Arredondo J, Chernyavsky AI, Marubio LM, Beaudet AL, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA (2005) Receptor-mediated tobacco toxicity; Regulation of gene expression through alpha3beta2 nicotinic receptor in oral epithelial cells. *Am J Pathol* 166:597–613
- Atsumi T, Chesney J, Metz C, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell R, Bucala R (2002) High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res* 62:5881–5887
- Attner P, Du J, Näsman A, Hammarstedt L, Ramqvist T, Lindholm J, Marklund L, Dalianis T, Munck-Wikland E (2010) The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer* 126:2879–2884. doi:10.1002/ijc.24994
- Bando H, Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Mishima S, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R, Koike T (2005) Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res* 11:5784–5792. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0149
- Batista AC, Costa NL, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar RdCG, Silva TA (2010) Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109:e74-9. doi:10.1016/j.tripleo.2009.10.034
- Beck R, Röper B, Carlsen JM, Huisman MC, Lebschi JA, Andratschke N, Picchio M, Souvatzoglou M, Machulla H-J, Piert M (2007) Pretreatment 18F-FAZA PET predicts success of hypoxia-directed radiochemotherapy using tirapazamine. *J Nucl Med* 48:973–980. doi:10.2967/jnumed.106.038570
- 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* 126:107–120. doi:10.1016/j.cell.2006.05.036
- 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
- Bocca C, Bozzo F, Miglietta A (2014) COX2 inhibitor NS398 reduces HT-29 cell invasiveness by modulating signaling pathways mediated by EGFR and HIF1- α . *Anticancer Res* 34:1793–1800
- Bose P, Brockton NT, Dort JC (2013) Head and neck cancer; From anatomy to biology. *Int J Cancer* 133:2013–2023. doi:10.1002/ijc.28112
- Botzer LE, Maman S, Sagi-Assif O, Meshel T, Nevo I, Yron I, Witz IP (2016) Hexokinase 2 is a determinant of neuroblastoma metastasis. *Br J Cancer* 114:759–766. doi:10.1038/bjc.2016.26

- Boxberg M, Bollwein C, Jöhrens K, Kuhn P-H, Haller B, Steiger K, Wolff K-D, Kolk A, Jesinghaus M, Weichert W (2019) Novel prognostic histopathological grading system in oral squamous cell carcinoma based on tumour budding and cell nest size shows high interobserver and intraobserver concordance. *J Clin Pathol* 72:285–294. doi:10.1136/jclinpath-2018-205454
- Bröer A, Wagner C, Lang F, Bröer S (2000) Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance. *Biochem J* 346 Pt 3:705–710
- Bruick RK, McKnight SL (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294:1337–1340. doi:10.1126/science.1066373
- Bussu F, Sali M, Gallus R, Vellone VG, Zannoni GF, Autorino R, Dinapoli N, Santangelo R, Martucci R, Graziani C, Miccichè F, Almadori G, Galli J, Delogu G, Sanguinetti M, Rindi G, Valentini V, Paludetti G (2013) HPV infection in squamous cell carcinomas arising from different mucosal sites of the head and neck region. Is p16 immunohistochemistry a reliable surrogate marker? *Br J Cancer* 108:1157–1162. doi:10.1038/bjc.2013.55
- Cantelmo AR, Conradi L-C, Brajic A et al (2016) Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell* 30:968–985. doi:10.1016/j.ccell.2016.10.006
- Cardesa A, Rudolph P, Mentzel T, Sloatweg PJ (2009) *Pathologie; Kopf-Hals-Region, Weichgewebstumoren, Haut*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Cerezo L, Liu FF, Tsang R, Payne D (1993) Squamous cell carcinoma of the lip; Analysis of the Princess Margaret Hospital experience. *Radiother Oncol* 28:142–147
- Chen J, Zhang S, Li Y, Tang Z, Kong W (2014) Hexokinase 2 overexpression promotes the proliferation and survival of laryngeal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 35:3743–3753. doi:10.1007/s13277-013-1496-2
- Cheng G, Zielonka J, Dranka BP, McAllister D, Mackinnon AC, Joseph J, Kalyanaraman B (2012) Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Res* 72:2634–2644. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3928
- Chesney J (2006) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9:535–539. doi:10.1097/01.mco.0000241661.15514.fb
- Chiara F, Castellaro D, Marin O, Petronilli V, Brusilow WS, Juhaszova M, Sollott SJ, Forte M, Bernardi P, Rasola A (2008) Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PLoS ONE* 3:e1852. doi:10.1371/journal.pone.0001852
- Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J (2010) Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis; A common feature in cancer. *J Cell Mol Med* 14:771–794. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x
- Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, Chen Q, Burk RD, Smith RV, Prystowsky MB, Belbin TJ, Schlecht NF (2009) Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 174:736–745. doi:10.2353/ajpath.2009.080731
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC (2008a) Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 452:181–186. doi:10.1038/nature06667
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC (2008b) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452:230–233. doi:10.1038/nature06734
- Dang CV (2010a) Glutaminolysis; Supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells? *Cell Cycle* 9:3884–3886. doi:10.4161/cc.9.19.13302

Dang CV (2010b) Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism. *Cancer Res* 70:859–862. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3556

Dang CV, Hamaker M, Sun P, Le A, Gao P (2011) Therapeutic targeting of cancer cell metabolism. *J Mol Med* 89:205–212. doi:10.1007/s00109-011-0730-x

DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008) The biology of cancer; Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7:11–20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002.

Denko NC (2008) Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 8:705–713. doi:10.1038/nrc2468.

DiMaio D, Petti LM (2013) The E5 proteins. *Virology* 445:99–114. doi:10.1016/j.virol.2013.05.006

Eckert (2008) Expression of Glut-1 is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma patients. *Oncol Rep*. doi:10.3892/or_00000156

Eckert AW, Lautner MHW, Schütze A, Bolte K, Bache M, Kappler M, Schubert J, Taubert H, Bilkenroth U (2010) Co-expression of Hif1alpha and CAIX is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *J Oral Pathol Med* 39:313–317. doi:10.1111/j.1600-0714.2009.00829.x

Eckert AW, Kappler M, Schubert J, Taubert H (2012) Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Maxillofac Surg* 16:189–196. doi:10.1007/s10006-012-0335-8

Eckert AW, Wickenhauser C, Salins PC, Kappler M, Bukur J, Seliger B (2016) Clinical relevance of the tumor microenvironment and immune escape of oral squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 14:85. doi:10.1186/s12967-016-0828-6

Eckert AW, Horter S, Bethmann D, Kotrba J, Kaune T, Rot S, Bache M, Bilkenroth U, Reich W, Greither T, Wickenhauser C, Vordermark D, Taubert H, Kappler M (2019) Investigation of the Prognostic Role of Carbonic Anhydrase 9 (CAIX) of the Cellular mRNA/Protein Level or Soluble CAIX Protein in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* 20. doi:10.3390/ijms20020375

Eckert AW (2009) Einfluss der Tumorphoxie auf die Prognose beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107:43–54

Evans SM, Hahn SM, Magarelli DP, Koch CJ (2001) Hypoxic heterogeneity in human tumors; EF5 binding, vasculature, necrosis, and proliferation. *Am J Clin Oncol* 24:467–472

Feng Y, Wu L (2017) mTOR up-regulation of PFKFB3 is essential for acute myeloid leukemia cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* 483:897–903. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.031

Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ (1995) Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem* 270:21021–21027

Fukuda R, Zhang H, Kim J-w, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL (2007) HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129:111–122. doi:10.1016/j.cell.2007.01.047

Fulda S, Debatin K-M (2007) HIF-1-regulated glucose metabolism; A key to apoptosis resistance? *Cell Cycle* 6:790–792. doi:10.4161/cc.6.7.4084

Ghesquière B, Wong BW, Kuchnio A, Carmeliet P (2014) Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature* 511:167–176. doi:10.1038/nature13312

- Giaccia A, Siim BG, Johnson RS (2003) HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2:803–811. doi:10.1038/nrd1199
- Goldstein BY, Chang S-C, Hashibe M, La Vecchia C, Zhang Z-F (2010) Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009; An update. *Eur J Cancer Prev* 19:431–465. doi:10.1097/CEJ.0b013e32833d936d
- Götz C, Drecoll E, Straub M, Bissinger O, Wolff K-D, Kolk A (2016) Impact of HPV infection on oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7:76704–76712. doi:10.18632/oncotarget.12501
- Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würfl P, Taubert H (2010) Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 126:73–80. doi:10.1002/ijc.24687
- Greither T, Würfl P, Grochola L, Bond G, Bache M, Kappler M, Lautenschläger C, Holzhausen H-J, Wach S, Eckert AW, Taubert H (2012) Expression of microRNA 210 associates with poor survival and age of tumor onset of soft-tissue sarcoma patients. *Int J Cancer* 130:1230–1235. doi:10.1002/ijc.26109
- Greither T, Vorwerk F, Kappler M, Bache M, Taubert H, Kuhnt T, Hey J, Eckert AW (2017) Salivary miR-93 and miR-200a as post-radiotherapy biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 38:1268–1275. doi:10.3892/or.2017.5764
- Gupta B, Johnson NW (2014) Systematic review and meta-analysis of association of smokeless tobacco and of betel quid without tobacco with incidence of oral cancer in South Asia and the Pacific. *PLoS ONE* 9:e113385. doi:10.1371/journal.pone.0113385
- Hamabe A, Yamamoto H, Konno M, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Nishida N, Kawamoto K, Koseki J, Doki Y, Mori M, Ishii H (2014) Combined evaluation of hexokinase 2 and phosphorylated pyruvate dehydrogenase-E1 α in invasive front lesions of colorectal tumors predicts cancer metabolism and patient prognosis. *Cancer Sci* 105:1100–1108. doi:10.1111/cas.12487
- Hamacher-Brady A, Brady NR (2016) Mitophagy programs; Mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci* 73:775–795. doi:10.1007/s00018-015-2087-8
- Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Dahlgren LO, Joneberg J, Creson N, Lindholm J, Ye W, Dalianis T, Munck-Wikland E (2006) Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer* 119:2620–2623. doi:10.1002/ijc.22177
- Han J, Meng Q, Xi Q, Wang H, Wu G (2017) PFKFB3 was overexpressed in gastric cancer patients and promoted the proliferation and migration of gastric cancer cells. *Cancer Biomark* 18:249–256. doi:10.3233/CBM-160143
- Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18:1926–1945. doi:10.1101/gad.1212704
- Herst PM, Berridge MV (2007) Cell surface oxygen consumption; A major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1767:170–177. doi:10.1016/j.bbabi.2006.11.018
- Hu C-J, Wang L-Y, Chodosh LA, Keith B, Simon MC (2003) Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23:9361–9374
- Hu C-J, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC (2007) The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Mol Biol Cell* 18:4528–4542. doi:10.1091/mbc.E06-05-0419
- Hui L, Zhang J, Guo X (2018) MiR-125b-5p suppressed the glycolysis of laryngeal squamous cell carcinoma by down-regulating hexokinase-2. *Biomed Pharmacother* 103:1194–1201. doi:10.1016/j.biopha.2018.04.098

- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292:464–468. doi:10.1126/science.1059817
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 12:149–162
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A von, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468–472. doi:10.1126/science.1059796
- Jamali Z, Asl Aminabadi N, Attaran R, Pournagiazar F, Ghertasi Oskouei S, Ahmadpour F (2015) MicroRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma; A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 51:321–331. doi:10.1016/j.oraloncology.2015.01.008
- Jung Y-S, Najy AJ, Huang W, Sethi S, Snyder M, Sakr W, Dyson G, Hüttemann M, Lee I, Ali-Fehmi R, Franceschi S, Struijk L, Kim HE, Kato I, Kim H-RC (2017) HPV-associated differential regulation of tumor metabolism in oropharyngeal head and neck cancer. *Oncotarget* 8:51530–51541. doi:10.18632/oncotarget.17887
- Kappler M, Pabst U, Rot S, Taubert H, Wichmann H, Schubert J, Bache M, Weinholdt C, Immel U-D, Grosse I, Vordermark D, Eckert AW (2017) Normoxic accumulation of HIF1 α is associated with glutaminolysis. *Clin Oral Investig* 21:211–224. doi:10.1007/s00784-016-1780-9
- Kappler M, Pabst U, Weinholdt C, Taubert H, Rot S, Kaune T, Kotrba J, Porsch M, Güttler A, Bache M, Krohn K, Bull F, Riemann A, Wickenhauser C, Seliger B, Schubert J, Al-Nawas B, Thews O, Grosse I, Vordermark D, Eckert AW (2019) Causes and Consequences of A Glutamine Induced Normoxic HIF1 Activity for the Tumor Metabolism. *Int J Mol Sci* 20. doi:10.3390/ijms20194742
- Kim S-G, Manes NP, El-Maghrabi MR, Lee Y-H (2006a) Crystal structure of the hypoxia-inducible form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3): a possible new target for cancer therapy. *J Biol Chem* 281:2939–2944. doi:10.1074/jbc.M511019200
- Kim J-w, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV (2006b) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase; A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3:177–185. doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002
- Kim J-w, Gao P, Liu Y-C, Semenza GL, Dang CV (2007) Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol* 27:7381–7393. doi:10.1128/MCB.00440-07
- Kim VN, Nam J-W (2006) Genomics of microRNA. *Trends Genet* 22:165–173. doi:10.1016/j.tig.2006.01.003
- Klussmann JP, Preuss SF, Speel EJ (2009) Humane Papillomviren und Oropharynxkarzinome. Molekulare Interaktion und klinische Auswirkung. *HNO* 57:113–122. doi:10.1007/s00106-008-1867-y
- Koivunen P, Hirsilä M, Remes AM, Hassinen IE, Kivirikko KI, Myllyharju J (2007) Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem* 282:4524–4532. doi:10.1074/jbc.M610415200
- Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV (2011) Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 11:325–337. doi:10.1038/nrc3038
- Koppikar P, Lui VWY, Man D, Xi S, Chai RL, Nelson E, Tobey ABJ, Grandis JR (2008) Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 5 contributes to tumor growth,

epithelial-mesenchymal transition, and resistance to epidermal growth factor receptor targeting. *Clin Cancer Res* 14:7682–7690. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1328

Kulshreshtha R, Ferracin M, Negrini M, Calin GA, Davuluri RV, Ivan M (2007) Regulation of microRNA expression; The hypoxic component. *Cell Cycle* 6:1426–1431

Lai SY, Johnson FM (2010) Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies; Implications for future therapeutic approaches. *Drug Resist Updat* 13:67–78. doi:10.1016/j.drug.2010.04.001

Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis; Novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21:3995–4004. doi:10.1128/MCB.21.12.3995-4004.2001

Lautner MHW (2008) Rolle des Tumorphoxiemarkers Glut-1 in Ergänzung zu klinischen Parametern für prognostische Aussagen beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

Lee HG, Kim H, Son T, Jeong Y, Kim SU, Dong SM, Park YN, Lee JD, Lee JM, Park JH (2016) Regulation of HK2 expression through alterations in CpG methylation of the HK2 promoter during progression of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7:41798–41810. doi:10.18632/oncotarget.9723

Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11:9–22. doi:10.1038/nrc2982

Levendag PC, Nowak PJ, van der Sangen MJ, Jansen PP, Eijkenboom WM, Planting AS, Meeuwis CA, van Putten WL (1996) Local tumor control in radiation therapy of cancers in the head and neck. *Am J Clin Oncol* 19:469–477

Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Kim J-w, Yustein JT, Lee LA, Dang CV (2005) Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* 25:6225–6234. doi:10.1128/MCB.25.14.6225-6234.2005

Li H-M, Yang J-G, Liu Z-J, Wang W-M, Yu Z-L, Ren J-G, Chen G, Zhang W, Jia J (2017) Blockage of glycolysis by targeting PFKFB3 suppresses tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 36:7. doi:10.1186/s13046-016-0481-1

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3:802–808. doi:10.1038/ncb0901-802

Listl S, Jansen L, Stenzinger A, Freier K, Emrich K, Hollecsek B, Katalinic A, Gondos A, Brenner H (2013) Survival of patients with oral cavity cancer in Germany. *PLoS ONE* 8:e53415. doi:10.1371/journal.pone.0053415

Liu Y, Wu K, Shi L, Xiang F, Tao K, Wang G (2016) Prognostic Significance of the Metabolic Marker Hexokinase-2 in Various Solid Tumors; A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 11:e0166230. doi:10.1371/journal.pone.0166230

Liu J-F, Deng W-W, Chen L, Li Y-C, Wu L, Ma S-R, Zhang W-F, Bu L-L, Sun Z-J (2018) Inhibition of JAK2/STAT3 reduces tumor-induced angiogenesis and myeloid-derived suppressor cells in head and neck cancer. *Mol Carcinog* 57:429–439. doi:10.1002/mc.22767

Lo Nigro C, Denaro N, Merlotti A, Merlano M (2017) Head and neck cancer; Improving outcomes with a multidisciplinary approach. *Cancer Manag Res* 9:363–371. doi:10.2147/CMAR.S115761

Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL (1995) Glucose catabolism in cancer cells. Isolation, sequence, and activity of the promoter for type II hexokinase. *J Biol Chem* 270:16918–16925

- Milosevic M, Fyles A, Hedley D, Hill R (2004) The human tumor microenvironment: invasive (needle) measurement of oxygen and interstitial fluid pressure. *Semin Radiat Oncol* 14:249–258. doi:10.1016/j.semradonc.2004.04.006
- Minchenko A, Leshchinsky I, Opentanova I, Sang N, Srinivas V, Armstead V, Caro J (2002) Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J Biol Chem* 277:6183–6187. doi:10.1074/jbc.M110978200
- Minchenko OH, Tsuchihara K, Minchenko DO, Bikfalvi A, Esumi H (2014) Mechanisms of regulation of PFKFB expression in pancreatic and gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 20:13705–13717. doi:10.3748/wjg.v20.i38.13705
- Mollenhauer M, Assmann G, Zengel P, Guntinas-Lichius O, Ihrler S (2014) HPV-assozierte oropharyngeale Karzinome. Aktueller Stand und Verhältnis zum Karzinom unbekannter Herkunft. *Pathologe* 35:127-40; quiz 141-2. doi:10.1007/s00292-013-1852-4
- Molnár L, Rónay P, Tapolcsányi L (1974) Carcinoma of the lip. Analysis of the material of 25 years. *Oncology* 29:101–121
- Murugan AK, Hong NT, Fukui Y, Munirajan AK, Tsuchida N (2008) Oncogenic mutations of the PIK3CA gene in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 32:101–111
- Nagpal JK, Mishra R, Das BR (2002) Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis. *Cancer* 94:2393–2400. doi:10.1002/cncr.10499
- National Cancer Institute (April 2017) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/. Zugegriffen: 22. Januar 2020
- National Comprehensive Cancer Network (2017) Clinical Practice Guidelines in Oncology. Head and Neck Cancer. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#site. Zugegriffen: 22. Januar 2020
- Navarro-Sabaté A, Manzano A, Riera L, Rosa JL, Ventura F, Bartrons R (2001) The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. *Gene* 264:131–138
- Nguyen NP, Chi A, Nguyen LM, Ly BH, Karlsson U, Vinh-Hung V (2010) Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer; A new clinical entity. *QJM* 103:229–236. doi:10.1093/qjmed/hcp176
- Nowak F, Soria J-C, Calvo F (2012) Tumour molecular profiling for deciding therapy-the French initiative. *Nat Rev Clin Oncol* 9:479–486. doi:10.1038/nrclinonc.2012.42
- Obach M, Navarro-Sabaté A, Caro J, Kong X, Duran J, Gómez M, Perales JC, Ventura F, Rosa JL, Bartrons R (2004) 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem* 279:53562–53570. doi:10.1074/jbc.M406096200
- Ogawa H, Nagano H, Konno M, Eguchi H, Koseki J, Kawamoto K, Nishida N, Colvin H, Tomokuni A, Tomimaru Y, Hama N, Wada H, Marubashi S, Kobayashi S, Mori M, Doki Y, Ishii H (2015) The combination of the expression of hexokinase 2 and pyruvate kinase M2 is a prognostic marker in patients with pancreatic cancer. *Mol Clin Oncol* 3:563–571. doi:10.3892/mco.2015.490
- Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve SM, Hua E, Bronder JL, Weil RJ, Davis S, Stark AM, Merino MJ, Kurek R, Mehdorn HM, Davis G, Steinberg SM, Meltzer PS, Aldape K, Steeg PS (2009) Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis. *Mol Cancer Res* 7:1438–1445. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0234

- Parks SK, Cormerais Y, Pouysségur J (2017) Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology. *J Physiol (Lond)* 595:2439–2450. doi:10.1113/JP273309
- Patel MS, Korotchkina LG (2001) Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation; Complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Exp Mol Med* 33:191–197. doi:10.1038/emm.2001.32
- Peng Q, Zhou J, Zhou Q, Pan F, Zhong D, Liang H (2009) Silencing hexokinase II gene sensitizes human colon cancer cells to 5-fluorouracil. *Hepatogastroenterology* 56:355–360
- Pontes FSC, Carneiro JT, Fonseca FP, da Silva TSP, Pontes HAR, Pinto DdS (2011) Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth; Analysis of survival rate and independent prognostic factors in the Amazon region. *J Craniofac Surg* 22:925–930. doi:10.1097/SCS.0b013e31820fe1cb
- Pore N, Jiang Z, Shu H-K, Bernhard E, Kao GD, Maity A (2006) Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1 α expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Mol Cancer Res* 4:471–479. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0234
- Remmele W, Stegner HE (1987) Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe* 8:138–140
- Robert Koch-Institut (2015) Krebs in Deutschland 2011/2012. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 10. Ausg. 2015
- Robert Koch-Institut (2017) Krebs in Deutschland für 2013/2014
- Roche TE, Baker JC, Yan X, Hiromasa Y, Gong X, Peng T, Dong J, Turkan A, Kasten SA (2001) Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70:33–75
- Rodgers LW, Stringer SP, Mendenhall WM, Parsons JT, Cassisi NJ, Million RR (1993) Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head Neck* 15:16–19
- Romeis B, Aescht E, Mulisch M (Hrsg) (2010) Romeis Mikroskopische Technik. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg
- Ros S, Schulze A (2013) Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer Metab* 1:8. doi:10.1186/2049-3002-1-8
- Rosenfeld E, Beauvoit B, Rigoulet M, Salmon J-M (2002) Non-respiratory oxygen consumption pathways in anaerobically-grown *Saccharomyces cerevisiae*; Evidence and partial characterization. *Yeast* 19:1299–1321. doi:10.1002/yea.918
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63:1129–1136
- Secomb TW, Hsu R, Ong ET, Gross JF, Dewhirst MW (1995) Analysis of the effects of oxygen supply and demand on hypoxic fraction in tumors. *Acta Oncol* 34:313–316
- Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:721–732. doi:10.1038/nrc1187
- Semenza GL (2008) Hypoxia-inducible factor 1 and cancer pathogenesis. *IUBMB Life* 60:591–597. doi:10.1002/iub.93.
- Semenza GL (2010) HIF-1; Upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 20:51–56. doi:10.1016/j.gde.2009.10.009
- Semenza GL (2013) HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 123:3664–3671. doi:10.1172/JCI67230

- Sethi S, Ali-Fehmi R, Franceschi S, Struijk L, van Doorn L-J, Quint W, Albashiti B, Ibrahim M, Kato I (2012) Characteristics and survival of head and neck cancer by HPV status; A cancer registry-based study. *Int J Cancer* 131:1179–1186. doi:10.1002/ijc.26500
- Sheta EA, Trout H, Gildea JJ, Harding MA, Theodorescu D (2001) Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1 α via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways. *Oncogene* 20:7624–7634. doi:10.1038/sj.onc.1204972
- Shiboski CH, Shiboski SC, Silverman S (2000) Trends in oral cancer rates in the United States, 1973-1996. *Community Dent Oral Epidemiol* 28:249–256
- Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, Tripathi RP, Gupta JP, Mathew TL, Ravindranath T, Jain V (2005) Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol* 181:507–514. doi:10.1007/s00066-005-1320-z
- Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB (2010) Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma; Does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg* 68:1270–1275. doi:10.1016/j.joms.2009.11.016
- Spinelli JB, Yoon H, Ringel AE, Jeanfavre S, Clish CB, Haigis MC (2017) Metabolic recycling of ammonia via glutamate dehydrogenase supports breast cancer biomass. *Science* 358:941–946. doi:10.1126/science.aam9305.
- Stransky N, Egloff AM, Tward AD et al (2011) The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 333:1157–1160. doi:10.1126/science.1208130
- Sturgis EM, Cinciripini PM (2007) Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence; An emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 110:1429–1435. doi:10.1002/cncr.22963
- Toyoda M, Kaira K, Ohshima Y, Ishioka NS, Shino M, Sakakura K, Takayasu Y, Takahashi K, Tominaga H, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K (2014) Prognostic significance of amino acid transporter expression (LAT1, ASCT2, and xCT) in surgically resected tongue cancer. *Br J Cancer* 110:2506–2513. doi:10.1038/bjc.2014.178
- Tramacere I, Negri E, Bagnardi V, Garavello W, Rota M, Scotti L, Islami F, Corrao G, Boffetta P, La Vecchia C (2010) A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 1; Overall results and dose-risk relation. *Oral Oncol* 46:497–503. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.03.024
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect; The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029–1033. doi:10.1126/science.1160809
- Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y (2004) CATs and HATs; The SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 447:532–542. doi:10.1007/s00424-003-1086-z
- Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489–501. doi:10.1038/nrc839
- Wang W-M, Zhao Z-L, Ma S-R, Yu G-T, Liu B, Zhang L, Zhang W-F, Kulkarni AB, Sun Z-J, Zhao Y-F (2015) Epidermal growth factor receptor inhibition reduces angiogenesis via hypoxia-inducible factor-1 α and Notch1 in head neck squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 10:e0119723. doi:10.1371/journal.pone.0119723
- Wang W, Liu Z, Zhao L, Sun J, He Q, Yan W, Lu Z, Wang A (2017) Hexokinase 2 enhances the metastatic potential of tongue squamous cell carcinoma via the SOD2-H2O2 pathway. *Oncotarget* 8:3344–3354. doi:10.18632/oncotarget.13763
- Wang C, Qu J, Yan S, Gao Q, Hao S, Zhou D (2018) PFK15, a PFKFB3 antagonist, inhibits autophagy and proliferation in rhabdomyosarcoma cells. *Int J Mol Med* 42:359–367. doi:10.3892/ijmm.2018.3599

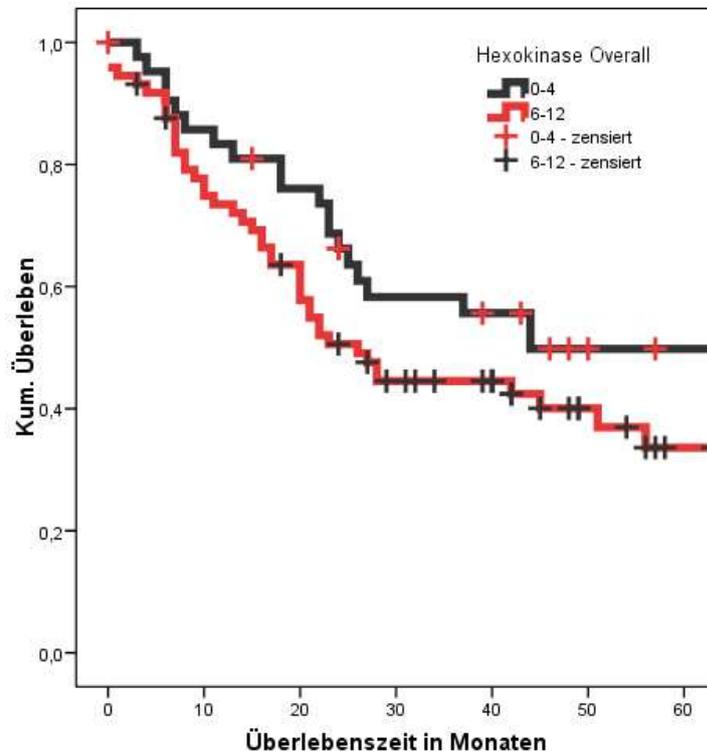
- Wang GL, Semenza GL (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270:1230–1237
- WARBURG O (1956) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124:269–270
- Warnakulasuriya S (2009) Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 45:309–316. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.06.002
- Wheeler SE, Suzuki S, Thomas SM, Sen M, Leeman-Neill RJ, Chiosea SI, Kuan C-T, Bigner DD, Gooding WE, Lai SY, Grandis JR (2010) Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene* 29:5135–5145. doi:10.1038/onc.2009.279
- Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang X-Y, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB (2008) Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18782–18787. doi:10.1073/pnas.0810199105
- Wittekind C, Meyer H-J (Hrsg) (2013) TNM; Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-VCH, Weinheim
- Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, Shen K, Scaria SM, Cantor JR, Sabatini DM (2016) Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* 351:43–48. doi:10.1126/science.aab2674
- Wong T-S, Liu X-B, Chung-Wai Ho A, Po-Wing Yuen A, Wai-Man Ng R, Ignace Wei W (2008) Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. *Int J Cancer* 123:251–257. doi:10.1002/ijc.23583.
- Wu J, Hu L, Wu F, Zou L, He T (2017) Poor prognosis of hexokinase 2 overexpression in solid tumors of digestive system; A meta-analysis. *Oncotarget* 8:32332–32344. doi:10.18632/oncotarget.15974.
- Xu Q, Zhang Q, Ishida Y, Hajjar S, Tang X, Shi H, Dang CV, Le AD (2017) EGF induces epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell properties in human oral cancer cells via promoting Warburg effect. *Oncotarget* 8:9557–9571. doi:10.18632/oncotarget.13771
- Yalcin A, Telang S, Clem B, Chesney J (2009) Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol* 86:174–179. doi:10.1016/j.yexmp.2009.01.003.
- Yalcin A, Clem BF, Imbert-Fernandez Y, Ozcan SC, Peker S, O'Neal J, Klarer AC, Clem AL, Telang S, Chesney J (2014) 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death Dis* 5:e1337. doi:10.1038/cddis.2014.292
- Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, Lerner AC, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R (1995) Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269:81–83
- Zancope E, Costa NL, Junqueira-Kipnis AP, Valadares MC, Silva TA, Leles CR, Mendonça EF, Batista AC (2010) Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 39:162–167. doi:10.1111/j.1600-0714.2009.00792.x
- Zengel P, Assmann G, Mollenhauer M, Jung A, Sotlar K, Kirchner T, Ihrler S (2012) Cancer of unknown primary originating from oropharyngeal carcinomas are strongly correlated to HPV positivity. *Virchows Arch* 461:283–290. doi:10.1007/s00428-012-1290-3
- Zhang H, Du X, Sun T-T, Wang C-L, Li Y, Wu S-Z (2017) Lectin PCL inhibits the Warburg effect of PC3 cells by combining with EGFR and inhibiting HK2. *Oncol Rep* 37:1765–1771. doi:10.3892/or.2017.5367
- Zhang S, Pei M, Li Z, Li H, Liu Y, Li J (2018a) Double-negative feedback interaction between DNA methyltransferase 3A and microRNA-145 in the Warburg effect of ovarian cancer cells. *Cancer Sci* 109:2734–2745. doi:10.1111/cas.13734

Zhang K, Zhang M, Jiang H, Liu F, Liu H, Li Y (2018b) Down-regulation of miR-214 inhibits proliferation and glycolysis in non-small-cell lung cancer cells via down-regulating the expression of hexokinase 2 and pyruvate kinase isozyme M2. *Biomed Pharmacother* 105:545–552.
doi:10.1016/j.biopha.2018.06.009

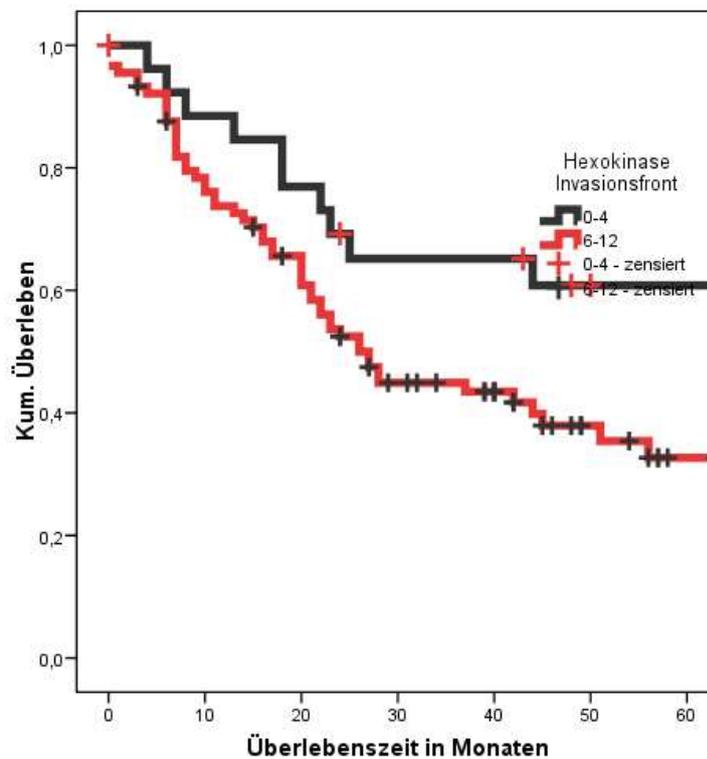
Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 14:391–396

8. Tabellenanhang

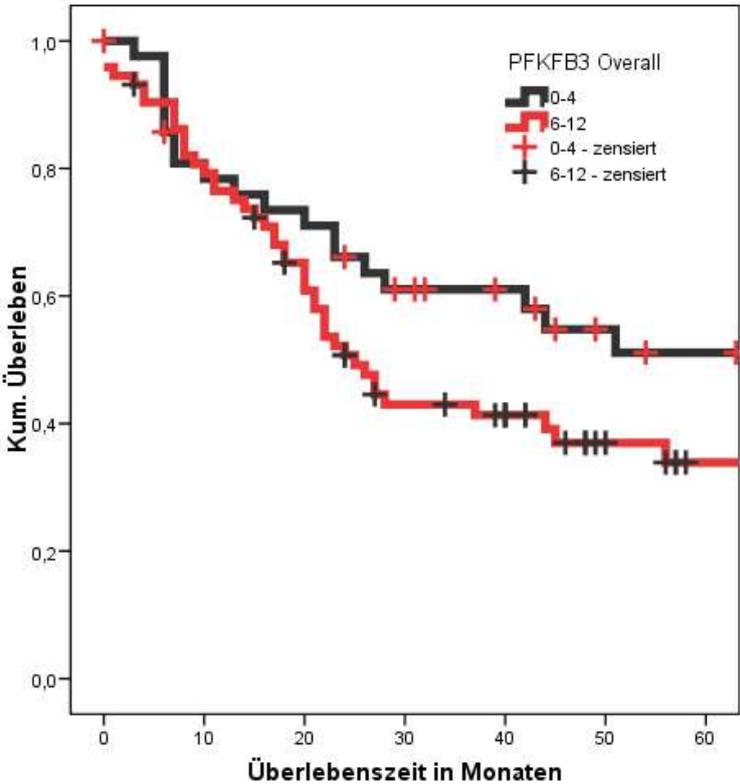
Kaplan-Meier-Kurve für die Hexokinase 2-Gesamtexpression



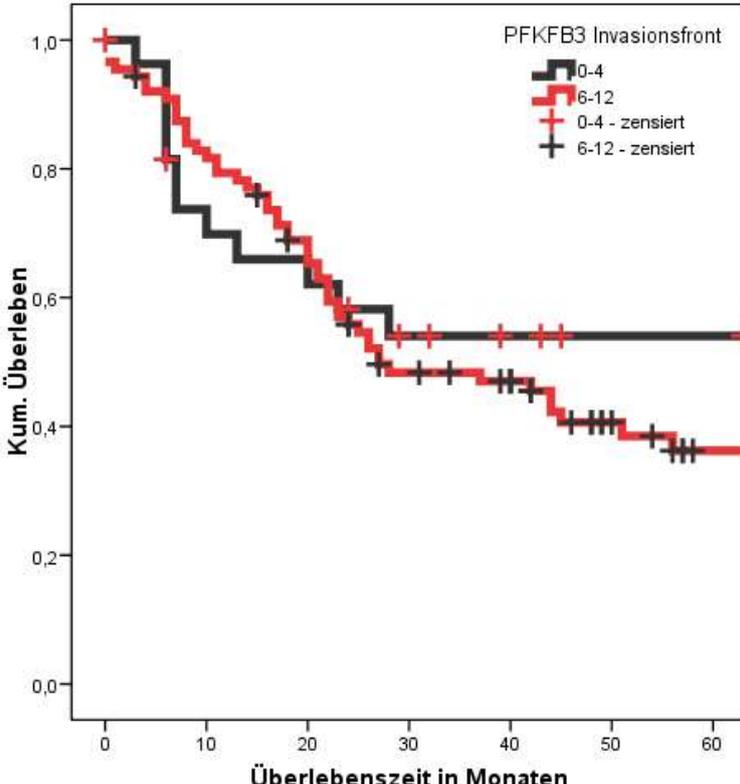
Kaplan-Meier-Kurve für die Hexokinase 2-Expression an der Invasionsfront



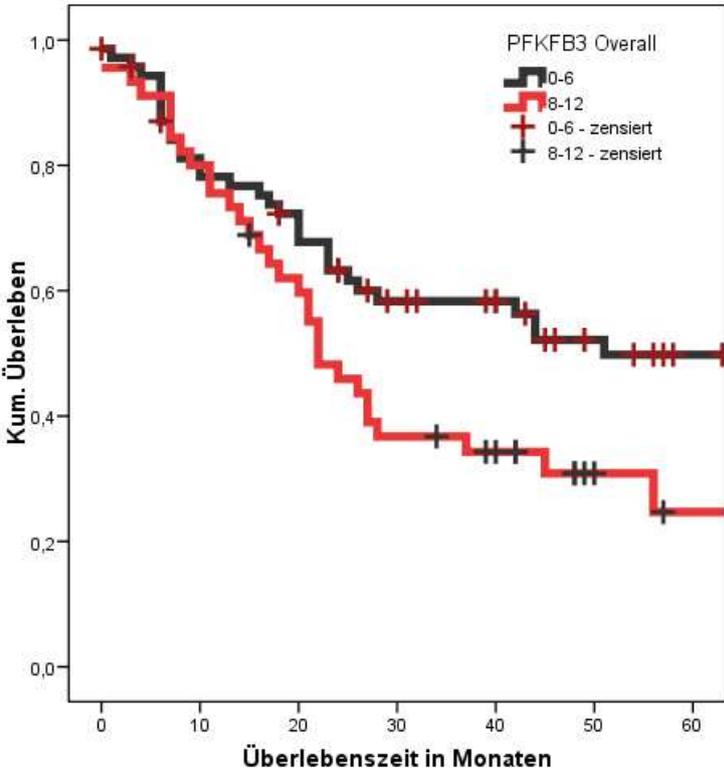
Kaplan-Meier-Kurve für die Gesamtexpression von PFKFB3



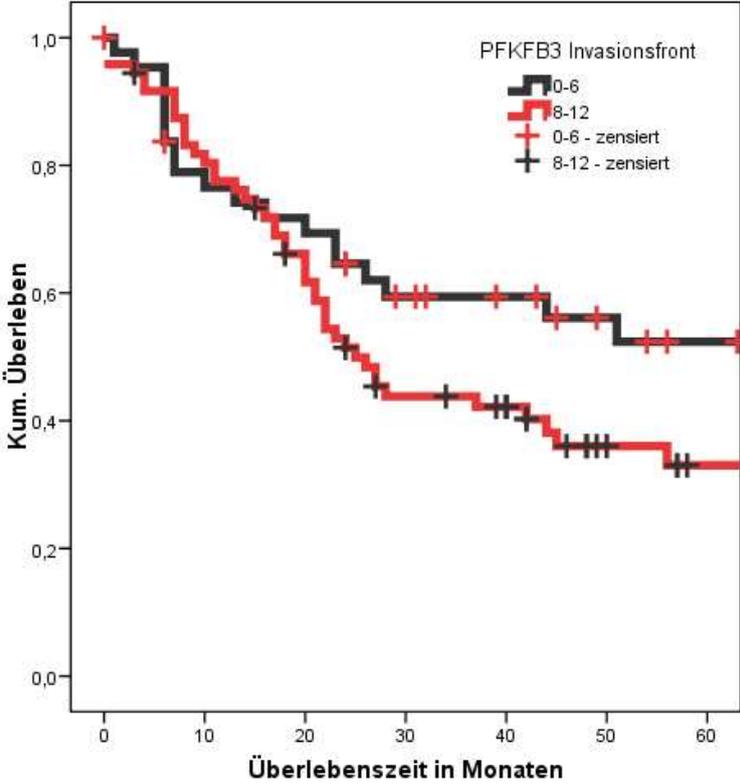
Kaplan-Meier-Kurve für die PFKFB3-Expression an der Invasionsfront



Kaplan-Meier-Kurve für die Gesamtexpression von PFKFB3 (alternativer Schwellenwert)



Kaplan-Meier-Kurve für die PFKFB3 Expression an der Invasionsfront (alternativer Schwellenwert)



Koexpression von PFKFB3 und Hexokinase 2 (Overall)

		PFKFB3	
		IRS 0-4	IRS 6-8
HK2	IRS 0-4	21	22
	IRS 6-8	22	51

9. Thesen

1. Die Prognose von Patienten mit oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen hat sich in den vergangenen Jahrzehnten nicht wesentlich verbessert und beträgt 40 bis 55 %. Die Charakterisierung molekularer Mechanismen bietet neue Möglichkeiten für eine zielgerichtete Therapie.

2. Die klassischen Parameter der TNM-Klassifikation und die dreistufige Graduierung sind für eine Prognoseabschätzung zur Therapiestratifizierung unzureichend. Es besteht daher die Notwendigkeit, weitere Marker zu identifizieren, welche zur Entscheidung über die weitere Therapie und Nachsorge miteinbezogen werden können.

3. Ein zentraler Prozess aller Tumorzellen und somit auch von OSCC und OPSCC ist die Glykolyse zur Deckung des ATP-Bedarfs. Dieser sogenannte Warburg-Effekt ist für diese Entität noch nicht hinreichend untersucht.

4. Das HIF1-System ist für den Metabolismus der Tumorzelle von entscheidender Bedeutung und hat Einfluss auf alle 12 Enzyme der Glykolyse. Die prognostische Relevanz von HIF1 ist für das OSCC und OPSCC bereits gezeigt worden. HIF1 α selbst hat eine kurze Halbwertszeit, so dass die Targetproteine in der Routine besser analysierbar sind.

5. Die Fünfjahresüberlebensrate des Patientenkollektivs (n=116, 90 Männer, 26 Frauen) lag bei 40% und war damit deutlich schlechter als aus klinisch retrospektiven Studien bekannt.

6. Die Prognose ist abhängig vom Tumorstadium, Nodalstatus und dem Geschlecht. Anders als in der Literatur angegeben, zeigt sich in der vorliegenden Untersuchung eine schlechtere Fünfjahresüberlebensrate von Frauen gegenüber Männern (34% vs. 45%).

7. Eine hohe Gesamtexpression von Hexokinase 2 ist statistisch signifikant mit einem schlechteren Überleben assoziiert (HR 1,79) und eignet sich als prognostischer Marker. Eine hohe Expression von Hexokinase an der Invasionsfront ist mit einem noch deutlich schlechteren Überleben dieser Tumorentität assoziiert (HR 2,4).

8. Weniger klar ist der Zusammenhang zwischen der PFKFB3 und dem OSCC und OPSCC: Eine hohe Gesamtexpression von PFKFB3 ist mit einer Tendenz für eine schlechtere Prognose assoziiert (HR 1,4). Die statistische Signifikanz wird hier jedoch verfehlt.

9. Für Klinik und Pathologie scheint die immunhistochemische Bestimmung der Hexokinase 2 eine sinnvolle und kostengünstige Erweiterung des Markerpanels für OSCC und OPSCC darzustellen.

10. Die prognostische Signifikanz der anderen Isoformen der PFKFB für das OSCC und OPSCC sollte in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden.

Lebenslauf

Name: Tobias Berg

Geburtsdatum: 02.10.1979

Geburtsort: Köln

Berufliche Tätigkeit:

Seit 12/2017 Weiterbildung Allgemeinmedizin

10/2017 bis 11/2017 Oberarzt, Städtisches Klinikum Dessau, Institut für Pathologie,
Chefarzt Dr. med. Jürgen Knolle

05/2015 bis 09/2017 Facharzt Pathologie im amedes Institut für Pathologie, Zytodiagnostik
und Humangenetik in Halle GmbH

07/2016 bis 09/2017 Chefarzt Funktionsabteilung für Pathologie, Carl von Basedow
Klinikum Merseburg

Seit 05/2015 Facharzt für Pathologie

04/2013 bis 05/2015 Arzt in Weiterbildung, amedes Institut für Pathologie und
Zytodiagnostik in Halle GmbH

06/2010 bis 09/2012 Arzt in Weiterbildung, Institut für Pathologie, Städtisches Klinikum
Dessau, Chefarzt Dr. med. Knolle

03/2010 bis 05/2010 Arzt in Weiterbildung, Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin,
Krankenhaus Köthen

05/2008 bis 05/2009 Arzt in Weiterbildung, Institut für Pathologie, Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

01/2007 bis 04/2008 Arzt in Weiterbildung, Medizinische Klinik I, St. Elisabeth-
Krankenhaus Halle (Saale)

Praktisches Jahr:

05/2006 bis 09/2006 BG-Kliniken Bergmannstrost, Halle, Klinik für Anästhesiologie und
Intensivmedizin

02/2006 bis 05/2006 Groote Schuur Hospital, Kapstadt, Südafrika, Department of Surgery,
Trauma Unit

10/2005 bis 02/2006 St. Elisabeth-Krankenhaus Halle (Saale), Medizinische Klinik

Universitäre Ausbildung:

1999 bis 2006 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Zivildienst:

08/1998 bis 08/1999 Psychiatrische Klinik Marienborn, Zülpich

Schulbildung:

1989-1998 Emil-Fischer-Gymnasium Euskirchen

1995/1996 Hennessey High School, Oklahoma, USA

1985-1989 Gemeinschaftsgrundschule Wichterich

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen entsprechend mittels Quellen gekennzeichnet habe. Weder diese noch eine andere Dissertation wurde von mir an einer anderen Fakultät zum Zwecke der Promotion eingereicht. Dies ist mein erstes Promotionsverfahren und ich habe in der Vergangenheit keine weiteren Promotionsversuche unternommen.

Halle, den 22.01.2020

Tobias Berg

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Dr. Alexander W. Eckert für Überlassung des Themas und die fortwährende Unterstützung während der Fertigstellung der Promotion.

Herrn Dr. Matthias Kappler danke ich herzlich für die konstruktive Kritik und den stets raschen und unkomplizierten Gedankenaustausch sowie die wertvollen Hinweise und Ratschläge.

Ich danke Frau Professor Dr. Claudia Wickenhauser für die Bereitstellung des Paraffinmaterial aus dem Patientenkollektiv. Ich danke Herrn Dr. Daniel Bethmann für Unterstützung bei der Auswahl der Paraffinschnitte.

Mein Dank gilt darüber hinaus allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie den Mitarbeitern des amedes MVZ für Pathologie, Zytodiagnostik und Humangenetik in Halle, besonders Frau Stefanie Hege, Herrn Dr. Olaf Frahm, Frau Aileen Schmidt und Frau Jessica Rudolph.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich zudem meinen akademischen Lehrern, Herrn Dr. Jürgen Knolle, Herrn Dr. Peter Herrmann-Trost und Herrn Professor Dr. Hans-Jürgen Holzhausen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meiner ganzen Familie. Frau Dr. Susan Klapötke danke ich für die immerwährende Motivation und die Geduld während der Fertigstellung der Promotion.