

Aus dem Institut für Virologie
Direktorin: Prof. Dr. Sigrun Smola
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchung der S100A8/S100A9-CD147 Achse in
Peniskarzinomen und beteiligten infiltrierenden
Immunzellen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2025**

vorgelegt von: Tobias Mohr
geb. am: 18.09.1995 in Lebach

Tag der Promotion 26.05.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Sigrun Smola

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kerstin Junker

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	5
II. Tabellenverzeichnis	10
III. Abbildungsverzeichnis	11
1. Zusammenfassung	12
1.1 Deutsche Zusammenfassung	12
1.2 Abstract (english)	14
2. Einleitung	16
2.1 Epidemiologie	16
2.2. Ätiologie und Risikofaktoren	18
2.2.1 HPV-Infektionen	18
2.2.2 Phimose	19
2.2.3 Chronische Inflammation	21
2.2.4 Traumatische Läsionen	22
2.2.5 Nikotinabusus	22
2.2.6 PUVA-Therapie.....	23
2.2.7 Hygiene, Promiskuität, Geschlechtserkrankungen	24
2.3 Präkanzerosen und Carcinoma in situ	25
2.3.1 Lichen sclerosus (et atrophicus), Balanitis xerotica obliterans.....	25
2.3.2 M. Bowen	26
2.3.3 Bowenoide Papulose	27
2.3.4 Erythroplasia de Queyrat.....	28
2.3.5 Buschke-Löwenstein Tumore	28
2.3.6 Extramammärer M. Paget	29
2.3.7 Penile intraepitheliale Neoplasie (PIN).....	30
2.4 TNM-Klassifikation, Grading, Histopathologie und Subtypen-Einteilung ..	30
2.4.1 TNM-Klassifikation	30
2.4.2 EAU-Klassifikation und Grading.....	31
2.4.3 Histopathologie und Subtypen-Einteilung	32
2.5 Diagnostik	37
2.6 Molekularpathologie	41

2.6.1 p16 ^{INK4A} -Expression	41
2.6.2 Tumorsuppressorgen TP53/TP63.....	42
2.6.3 Ki-67-Proliferationsindex.....	44
2.6.4 TMB	44
2.6.5 PD-1/PD-L1-Expression	45
2.6.6 EGFR.....	47
2.6.7 VEGF.....	49
2.6.8 SCCA.....	50
2.7 Therapie.....	51
2.7.1 Oberflächliche, nicht-invasive Peniskarzinome (CIS, PIN)	52
2.7.2 Invasive Tumore der Glans (T1/T2)	53
2.7.3 Fortgeschrittene Tumore mit Invasion der Corpora cavernosa und benachbarten Strukturen (T3/T4)	54
2.7.4 Chemotherapie.....	55
2.7.5 Immuntherapie und Proteinkinaseinhibitoren	55
2.7.6 Palliative Strahlentherapie.....	55
2.8 Prognose	56
2.9 Humane Papillomviren.....	56
2.9.1 Epidemiologie	56
2.9.2 Virus-Aufbau und Struktur.....	57
2.9.3 Viraler Lebenszyklus (Infektionsweg, Inkubationszeit, Replikation)	58
2.9.4 Virale Onkoproteine und Karzinogenese	60
2.10 S100-Proteine	62
2.10.1 Aufbau und Struktur.....	62
2.10.2 Physiologische Funktionen	62
2.10.3 Rolle in chronisch inflammatorischen Prozessen und Karzinogenese	63
2.10.4 Einfluss auf Immunzellinvasion und Tumormikromilieu.....	64
2.11 Cluster of differentiation 147 (CD147).....	66
2.11.1 Aufbau und Struktur.....	66
2.11.2 Physiologische Funktionen	67
2.11.3 Rolle in der Karzinogenese	69
2.11.4 Einfluss auf das Tumormikromilieu.....	70

2.12 Fragestellung	72
3. Material und Methoden	73
3.1 Ethikantrag, Kohorte und Studiendesign, Materialidentifizierung	73
3.2 Immunhistochemie und Auswertung der Färbung.....	74
3.3 Zelllinien und Kulturbedingungen	75
3.4 Datenverarbeitung und statistische Analysen	76
4. Ergebnisse	78
4.1 Die Inzidenzrate des Peniskarzinoms steigt.....	78
4.2 Untersuchtes Patientenkollektiv	79
4.3 IHC-Färbung von S100A8/A9 und CD147 im Tumorgewebe sowie Immuninfiltrat in TMAs, Gewebeschnitten und Zellkulturen	85
4.3.1 IRS von S100A8/A9 der TMAs	85
4.3.2 Färbemuster von S100A8/A9 in Gewebegeschnitten	88
4.3.3 S10A8/A9-Färbung in 3D-Kulturen peniler Karzinom-Zelllinien und Vorhautkeratinozyten	90
4.3.4 IHC-Kofärbung von S100A8/A9+CD15 der TMAs.....	92
4.3.5 IRS von CD147 (EMMPRIN) der TMAs	93
4.4 S100A8 ⁺ S100A9 ⁺ CD15 ⁺ -positives Immuninfiltrat als Charakteristikum in HPV-positive PeCa Proben	97
4.5 Das HPV ⁺ S100A8 ⁺ S100A9 ⁺ CD15 ⁺ -Markerprofil zeigt unterschiedliche Ausprägungen unter den Subtypen	99
4.6 Erhöhte Expression des IHC-Markerprofils in PeCas als Prädiktor einer disseminierten Erkrankung.....	102
4.6.1 S100A8/A9	102
4.6.2 Charakterisierung der CD147-Expression in PeCa.....	104
4.7 Assoziation des Biomarker-Profiles mit invasivem und metastasierenden Wachstum der verschiedenen PeCa-Subtypen.....	106
4.8 Assoziation des histologischen Grading mit den immunhistochemischen Biomarkern und dem HPV-Status.....	109
5. Diskussion	111
5.1 Probleme der Stadieneinteilung auf Grund der 8. TNM-Klassifikation.....	111
5.2 Analysen zur Risikostratifizierung – der aktuelle Stand.....	113
5.3 TMAs - Ausschnitt eines komplexen Systems.....	119

5.4 Beschränkungen des Kollektivs	123
5.5 Potenzieller Einfluss der untersuchten und etablierten Biomarker auf den Tumor und das Immuninfiltrats innerhalb des TME	125
5.6 Mögliche Angriffspunkte für zukünftige Therapien	133
6. Literaturverzeichnis:.....	143
7. Danksagung	157
8. Lebenslauf	158

I. Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolaevulinsäure
ADCC	Antikörper-abhängige Neutrophilen-vermittelte Zytotoxizität
AK	Antikörper
ASR	Altersstandardisierte Inzidenzrate
BCC	Basalzellkarzinom
BLT	Buschke-Löwenstein-Tumor
BP	Bowenoide Papulose
Bspw.	Beispielsweise
Bzw.	Beziehungsweise
Ca	Karzinom
CAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten
CD	Cluster of Differentiation
CeSCC	Cervix Plattenepithelkarzinom
CGP	Genomisches Tumorprofiling
CI	Konfidenzintervall
CNA	Kopienzahlvariation
CRGA	Klinisch relevante genomische Alterationen
CRP	C-reaktives Protein
CSM	Cancer-Specific Mortality
CSS	Cancer-Specific Survival
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DFS	Disease-Free Survival
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOD	Died of Disease
DSNB	Dynamische Sentinel-Lymphknotenbiopsie
DSS	Disease-Specific Survival
EDC	Epidermaler Differenzierungskomplex

EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	Epithelmembran-Antigen
EMMPRIN	Extrazellulärer Matrix-Metalloproteinasen-Induktor
EMPD	Extramammärer Morbus Paget
EQ	Erythroplasia de Queyrat
EV	Epidermodysplasia verruciformis
e.V.	Eingetragener Verein
EZM	Extrazellulärmatrix
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FNB	Feinnadelbiopsie
G	Grading
GA	Genomische Alterationen/Veränderungen
HDR	High Dose Rate
HFFC	Menschliche Vorhaut-Fibroblasten-Zellen
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HLA	Humane Leukozytenantigene
HNSCC	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom
HPV	Humanes Papillomvirus
HR	Hazard Ratio
HR-HPV	High-Risk-HPV
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung
ICD	Internationale Klassifikation der Krankheiten
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitoren
IF	Invasionsfront
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IRS	Immunreaktiver Score

IRR	Inzidenzratenverhältnis
ISH	In-situ-Hybridisierung
KRK	Kolorektales Karzinom
LAD	Lymphadenektomie
LDR	Low Dose Rate
LJ	Lebensjahre
LK	Lymphknoten
LKM	Lymphknotenmetastase
LR-HPV	Low-Risk-HPV
LS	Lichen sclerosus
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MDSC	Myeloische Suppressorzellen
MFS	Metastasis-Free Survival
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MIL	Modifizierte inguinale Lympadenektomie
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MP	Morbus Paget
MSA	Muscle specific actin
MVP	Variable Methylierungsposition
NFK	Gewöhnliche Vorhautkeratinozyten
NGO	Nichtregierungsorganisation
NGS	Next-Generation-Sequencing
NMSC	Nichtmelanozytärer Hautkrebs
NO	Normalgewebe
OLR	Offener Leserahmen
OR	Odds Ratio
OR	Östrogenrezeptor

ORR	Gesamtansprechrte
OS	Gesamtüberleben
PAE	Early polyadenylation site
PAL	Late polyadenylation site
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDD	Photodynamische Diagnostik
PDR	Pulsed Dose Rate
PE	Early Promoter
PeCa	Peniskarzinom
PFS	Progression-Free Survival
PIN	Penile intraepitheliale Neoplasie
PL	Late Promoter
PMN	Polymorphnukleär
PR	Progesteronrezeptor
PSCC	Peniles Plattenepithelkarzinom
PSCCIS	Pagetoides SCC in situ
PUVA	Psoralen mit UV-A
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
RIL	Radikale inguinale Lymphadenektomie
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RR	Relative Risk
SCC	Plattenepithelkarzinom
SCCA	Plattenepithelkarzinom-Antigen
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt
SMA	Smooth Muscle Actin
SPION	Supramagnetische Eisenoxid-Nanopartikel
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCSF	Human tumor cell derived collagenase stimulation factor

TIM	Tumor-infiltrierende Makrophagen
TMA	Tissue-Micro-Array
TMB	Tumormutationslast
TNM	Tumor/Nodus/Metastasen-Klassifikation
TSA	Tumor-spezifische Antigene
TTP	Time to progression
TZ	Tumorzentrum
U.a.	Unter anderem
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs
UK	Vereinigtes Königreich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VS	Versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WMA	Weltärztebund
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Patientenkollektiv und Tumor-Charakteristika:.....	81
Tabelle 2 Prognose der verschiedenen Subtypen des penilen SCC:.....	117

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Epidemiologie des Peniskarzinoms:	79
Abbildung 2 Auswertung der Patientenkohorte nach Alter, Grading und HPV-Status:	83
Abbildung 3 Heatmap-Übersicht des Patientenkollektivs eingeteilt nach Subtypen, mit Alter, Grading und HPV-Status in nominaler und prozentualer Darstellung (von links nach rechts):.....	85
Abbildung 4 IRS der PeCa-Proben für die S100A8/A9-Färbung:.....	87
Abbildung 5 Repräsentative Färbung für S100A8 in PeCa-Gewebe:	89
Abbildung 6 Repräsentative Färbung für S100A9 in PeCa-Gewebe:	90
Abbildung 7 Calprotectin-Expression in HPV-positiver 3D-Kulturen von NFK- und PeCa-Zelllinien:.....	92
Abbildung 8 Infiltrierende S100A8+S100A9+-Immunzellen in PeCa-Tumoren:	93
Abbildung 9 IRS der PeCa-Proben für die CD147:	96
Abbildung 10 S100A8/A9 ist assoziiert mit HPV-positiven, invasiven, metastasierten Peniskarzinomen mit infiltrierenden Neutrophilen:.....	98
Abbildung 11 Korrelation von S100A8, S100A9, CD15 und positivem HPV-Status mit dem histologischen Subtyp:	101
Abbildung 12 Korrelation der Invasivität und der Metastasierung mit S100A8, S100A9 und HPV-Status des untersuchten PeCa-Kollektivs:	104
Abbildung 13 Korrelation des CD147-Status mit invasivem Wachstum und Metastasierung:	105
Abbildung 14 Einteilung der PeCa-Proben nach histopathologischem Subtyp und Ausdehnung nach TNM mit positivem IRS für S100A8, S100A9, CD15 und positivem HPV-Status:	108
Abbildung 15 Grading der PeCa-Proben aufgeteilt nach Subtypen in Korrelation mit IHC-Färbeparametern (S100A8+, S100A9+, CD15+, CD147+) und HPV-Status:	110
Abbildung 16 Vergleich der Subtypenverteilung und des HPV-Status:.....	124
Abbildung 17 Modell der CXCL8-Calprotectin-CD147-Neutrophilen-Achse: 132	
Abbildung 18 mCD147-Expression mindert die Empfänglichkeit für ADCC: 141	

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Übersicht: Das penile Plattenepithelkarzinom (PeCa) ist eine seltene Tumorentität in den Industriestaaten Europas und Nordamerikas, macht aber bis zu 10% der Malignome bei Männern in Entwicklungsländern wie Uganda aus. Neben der aktuellen WHO-Klassifikation, die zwischen HPV-positiven und -negativen Tumoren unterscheidet, etabliert sich immer mehr das Konzept die Subtypen stärker in Diagnostik, Therapie und Prognose einzubeziehen. Das Plattenepithelkarzinom macht 95% aller penilen Malignome aus, seltener sind andere Tumorentitäten wie Adenokarzinome, Melanome oder Sarkome. Als „orphan disease“ besteht ein Defizit bezüglich groß angelegter Studien zu potenziellen diagnostischen und möglicherweise therapeutisch verwendbaren Biomarkern zur Therapieplanung, Prognosekalkulation und Verlaufskontrolle. Bisher hat sich neben p16, als Surrogatmarker für eine HPV-getriebene Karzinogenese, in den Leitlinien und außerhalb von Studien kein histopathologischer Biomarker etabliert. Aufgrund von Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe untersucht diese Arbeit mittels IHC-Färbung die S100A8/A9-, CD15- und CD147-Expression in PeCa-Proben aus Invasionsfront, Tumorzentrum und Lymphknotenmetastasen im Zusammenhang zu den klinischen Patientendaten sowie dem Vorhandensein von Immunzellinfiltraten in den untersuchten Proben.

Material und Methodik: Insgesamt wurden TMA-Proben von 92 Patienten aus Deutschland und Russland zwischen 1992 und 2015, jeweils für Invasionsfront (IF), Tumorzentrum (TZ) und Lymphknotenmetastasen (LKM) untersucht. Zusätzlich wurden auch Normalgewebe (NO) und reguläre Tumorschnitte verwendet. Nach dem Ausschluss nicht auswertbarer Proben und solchen mit fehlenden Daten, verblieben 74 Patienten in der untersuchten Kohorte. Die TMAs wurden von 2 erfahrenen Uropathologen histopathologisch nach der WHO-Klassifikation von 2016 und der 8. Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumore eingeteilt. Der HPV-Status wurde durch PCR DNA-Nachweis und die immunhistochemische p16-Expression definiert. Die S100A8-, S100A9-, CD15 und CD147-Expression wurden mittels IHC nachgewiesen. Ergänzend erfolgten auch Versuche an einem in vitro PeCa-Zelllinienmodell zur S100A8/A9-Färbung der 3D-organotypischen Kulturen.

Ergebnisse: Das mittlere Alter der Patienten betrug 61 Jahre, die meisten zeigen ein Grading von 2 (55,4%), 46 (62,2%) wiesen invasives und 22 (29,8%) metastasierendes Tumorwachstum auf. 29 Patienten (39,2%) sind HPV⁺, 45 (60,8%) sind HPV⁻. Im untersuchten Kollektiv sind neun verschiedene histologische Subtypen identifiziert worden. Alle LKM zeigten sich

S100A8⁺/A9⁺ und CD147⁺, das TZ war signifikant stärker positiv als die IF. HPV⁺-Proben mit positiver S100A8/A9- und CD147-Färbung waren häufiger mit Metastasen assoziiert. Die CD147-Färbung war im Tumorgewebe signifikant stärker als im Normalgewebe. Neutrophile Immuzellinfiltrate fanden sich als S100A8⁺/A9⁺/CD15⁺-Zellen in vielen Tumorproben, dort assoziiert mit einer schlechteren Differenzierung und Auftreten von LKM. In vitro Färbungen für S100A8/A9 zeigten eine positive Färbung, jedoch insbesondere hinsichtlich der LKM weniger ausgeprägt als in der TMA-Färbung.

Schlussfolgerung: Es sind weitere Analysen größerer retrospektiver Auswertungen oder zukünftige prospektive Studien nötig, um diese Daten zu verifizieren, insbesondere im Hinblick auf die Korrelationen zum HPV-Status und den dazu assoziierten Subtypen. So könnten unter anderem weitere Hinweise für ein erhöhtes oder frühes Metastasierungspotential in die inguinalen Lymphknoten durch S100A8/A9+CD15 positive Infiltrate und eine entsprechende Tumorfärbung gefunden werden. Weiter könnte S100 und CD147 so als möglicher Marker im Tumormikromilieu dazu dienen Neutrophile zu erkennen, die eine prämetastatische Loge in Lymphknoten und Organen für eine Metastasierung schaffen und so zur Risikokalkulation und Therapieplanung dienen. Auf Grund der hier gezeigten Subgruppen-Analyse mit verstärktem Auftreten von Lymphknotenmetastasen in HPV⁺-S100A8⁺/A9⁺-CD147⁺-Proben kann pauschal keine bessere Prognose bei HPV-positivem Status analog anderer Tumorentitäten quitiert werden. Es ist wichtig einheitliche diagnostische Methodiken und Definitionen zum HPV-Status zu etablieren, um Studien besser vergleichbar zu machen.

1.2 Abstract (english)

Investigation of the S100A8/S100A9-CD147 axis in penile carcinomas and involved infiltrating immune cells

Purpose: Penile squamous cell carcinoma (PeCa) is a rare tumor entity in the industrialized countries of Europe and North America, but accounts for up to 10% of malignancies in men in developing countries such as Uganda. In addition to the current WHO classification, which distinguishes between HPV-positive and negative tumors, the concept of including subtypes more strongly in diagnostics, therapy and prognosis is becoming increasingly established. Squamous cell carcinoma accounts for 95% of all penile malignancies; other tumor entities such as adenocarcinomas, melanomas or sarcomas are less common. As an "orphan disease", there is a lack of large-scale studies on potential diagnostic and possibly therapeutically applicable biomarkers for therapy planning, prognosis calculation and follow-up. To date, apart from p16, as an HPV surrogate marker, no histopathological biomarker has been established in the guidelines or outside of studies. Therefore, this study uses IHC staining to investigate S100A8/A9, CD15 and CD147 expression in PeCa samples from the invasion front, tumor center and lymph node metastases in relation to clinical patient data and the presence of immune infiltrates in the samples examined.

Materials and Methods: In total, TMA samples from 92 patients from Germany and Russia between 1992 and 2015 were analyzed for invasion front (IF), tumor center (TZ) and lymph node metastases. Normal tissue (NO) and regular tumor sections were also used. After excluding non-evaluable samples and those with missing data, 74 patients remained in the cohort under investigation. The TMAs were histopathologically classified by 2 experienced uropathologists according to the WHO classification of 2016 and the 8th edition of the TNM classification of malignant tumors. HPV status was defined by PCR DNA detection and immunohistochemical p16 expression. S100A8, S100A9, CD15 and CD147 expression was detected by IHC. In addition, experiments were also performed on an in vitro PeCa cell line model for S100A8/A9 staining of the 3D organotypic cultures.

Results: The median age of patients was 61 years, most showed a grading of 2 (55.4%), 46 (62.2%) showed invasive and 22 (29.8%) metastatic tumor growth. 29 patients (39.2%) were HPV⁺, 45 (60.8%) were HPV⁻. Nine different histologic subtypes were identified in the investigated collective. All LKM were S100A8⁺/A9⁺ and CD147⁺, the TZ was significantly more positive than the IF. HPV⁺ samples with positive S100A8/A9 and CD147 staining were more frequently associated with metastases. CD147 staining was significantly stronger in tumor

tissue than in normal tissue. Neutrophil immune infiltrates were present as S100A8⁺/A9⁺/CD15⁺ cells in many tumor samples, where they are associated with poor differentiation and occurrence of LKM. In vitro staining for S100A8/A9 showed positive staining, but less pronounced than in TMA staining, particularly regarding LKM.

Conclusion: Further analyses of larger retrospective evaluations and future prospective studies are required to verify these data, particularly with regard to the correlations with HPV status and the associated subtypes. For example, further evidence for an increased or early metastatic potential to the inguinal lymph nodes could be found through S100A8/A9+CD15 positive infiltrates and tumor staining. Furthermore, S100 and CD147 as a possible marker in the tumor microenvironment could be used to detect neutrophils that create a pre-metastatic niche in lymph nodes and organs for metastasis and thus serve for risk calculation and therapy planning. Due to the subgroup analysis shown here with an increased occurrence of lymph node metastases in HPV+-S100A8+/A9+-CD147+ samples, a better prognosis cannot be generally confirmed for HPV-positive status analogous to other tumor entities. It is important to establish uniform diagnostic methods and definitions of HPV status to make studies more comparable.

2. Einleitung

2.1 Epidemiologie

Das Peniskarzinom (PeCa) ist global betrachtet ein seltener maligner Tumor, dessen Inzidenz jedoch starken regionalen Schwankungen unterliegt. Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter, so dass die Mehrzahl der Tumore in der 6-7. Lebensdekade auftritt (<50LJ 9,8%, 50-69LJ 39,5%, \geq 70LJ 56,62%) (Sievert, Drager et al. 2018). Manche Autoren beschreiben aber auch die 8. Lebensdekade als Zeitpunkt der höchsten Inzidenz. Aus bisher nicht endgültig geklärten Gründen erkranken Männer in manchen Regionen und ethnischen Gruppen früher (Curado, Shin et al. 2007).

In Europa liegt die Inzidenz bei ca. 0,2-1,4/100.000, diese steigt in strukturschwacher Regionen und Hochrisiko-Populationen auf bis zu 2,1/100.000 (Curado, Shin et al. 2007, Colberg, van der Horst et al. 2018). Nach Informationen des Zentrums für Krebsregisterdaten des RKI schwankte die Alters-standardisierte Rate (ASR)/100.000 Einwohner in Deutschland zwischen 1999 und 2016 zwischen 0,8 und 1,6, was beispielhaft in den Jahren 2011-2014 805, 900, 776 und 950 Neuerkrankungen entspricht (Robert Koch-Institut 2024).

Die Inzidenz in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) als strukturähnliche Industrienation beträgt ebenso etwas unter 1/100.000, wobei hier signifikante Unterschiede in der Bevölkerung zu beachten sind (Parkin and Bray 2006, Curado, Shin et al. 2007). Die Daten aus insgesamt 29 Krebsregistern aus den Jahren 1995-2003 spiegeln 68% der US-Bevölkerung wider, daraus abgeleitet wurden verschiedene ASR (1.000.000/Einwohner) für verschiedene ethnische Gruppen der US-Bevölkerung (Goodman, Hernandez et al. 2007). Die ASR der weißen (3,9) und der afroamerikanischen (ASR 4,02) Bevölkerung war hierbei vergleichbar, während die Ethnie der als asiatisch-pazifischen Inselbewohner Bezeichneten nur halb so oft erkrankte (ASR 2,4) (Goodman, Hernandez et al. 2007). Die höchste Inzidenz zeigen allerdings Hispano-Amerikaner mit einer ASR von 6,58, diese erkranken somit im Vergleich zu Nicht-Hispano-Amerikanern 72% häufiger (Goodman, Hernandez et al. 2007, Hernandez, Barnholtz-Sloan et al. 2008). Die amerikanischen Ureinwohner nehmen mit einer ASR von 2,81 eine intermediäre Rolle ein. Vergleicht man die weiße und afroamerikanische Bevölkerung und die Hispano-Amerikaner mit den Nicht-Hispano-Amerikanern fällt auf, dass Afroamerikaner und Hispanos in jüngerem Alter erkranken, bei Diagnose fortgeschrittenere Primärtumoren und resultierend eine höhere Mortalität aufweisen (Parkin and Bray 2006, Goodman, Hernandez et al. 2007, Hernandez, Barnholtz-Sloan et al. 2008).

In Entwicklungs- und Schwellenländern Afrikas, Asiens und Südamerikas ist die Inzidenz global am höchsten und liegt hier im Durchschnitt bei 3,7/100.000 (Uganda 4,4, Indien 0,7-3, Paraguay 4,2, Brasilien 6-8). Es liegt also eine Inzidenzerhöhung um das 4-8fache im Vergleich zu Europa oder Nordamerika vor, die in manchen Regionen wie Goiania in Brasilien, Chiang Mai in Thailand oder Kyadondo in Uganda sogar 10-20fach größer ist (Goodman, Hernandez et al. 2007). Während in Europa und den USA das Peniskarzinom 0,4-0,6% der männlichen Malignome ausmacht, sind es in diesen Ländern bis zu 10% der diagnostizierten Tumore bei Männern (Horenblas, Kroon et al. 2008, Bleeker, Heideman et al. 2009).

In Ländern, in denen aus kulturellen und religiösen Gründen eine neonatale Zirkumzision durchgeführt wird, wie zum Beispiel in den Ländern Nordafrikas, der arabischen Halbinsel oder Israel ist die Inzidenz verschwindend gering ($\leq 0,1/100.000$). Ähnliches ist in Indien oder Nigeria zu beobachten, hier ist die Inzidenz auf die Gesamtbevölkerung hoch, aber in den muslimischen Teilen der Bevölkerung sehr gering (Schoeneich, Heimbach et al. 1999).

Die geographischen Schwankungen im Auftreten des Peniskarzinoms werden oft mit schlechter Bildung, dem Leben in ländlichen Gegenden und einem generell schlechten sozioökonomischen Status verknüpft. In Ländern wie Paraguay, in denen 20% der Menschen in Armut leben, ist das Risiko zu erkranken 43% höher als in Ländern und Regionen mit weniger als 10% der Bevölkerung unterhalb der Armutsgrenze (Hernandez, Barnholtz-Sloan et al. 2008). Wenn hierbei zwischen urbanem, suburbanem und ländlichem Lebensraum unterschieden wird, gilt es jedoch zu beachten, dass beispielsweise der suburbane Lebensraum von Ländern der Ersten, nicht mit denen in Ländern der Dritten Welt verglichen werden kann. Die Lebensbedingungen hier sind wesentlich härter und die Menschen sind sozioökonomisch, wie auch medizinisch unterversorgt. Ein Beispiel für solche Unterschiede ist die hohe Inzidenz des Peniskarzinoms im Norden und Nordosten Brasiliens, wie dem Bundesstaat Bahia. Die wichtigste Klinik des öffentlichen Gesundheitssystems zur onkologischen Versorgung des Peniskarzinoms liegt in Salvador, hier werden auch die meisten PeCa-Patienten des Landes behandelt. Die Brazilian Society of Urology schätzt anhand retrospektiver Daten, dass von allen Fällen in Brasilien 42% der Karzinome im Nordosten und 40% im Norden auftreten. Nicht nur die Anzahl der Neuerkrankungen, sondern auch das Patientenalter unterschieden sich hier im Vergleich zu dem Rest des Landes. Zwischen 1997 und 2007 waren 17% der Erkrankten jünger als 40 Jahre, ihre krankheitsspezifische Mortalität lag bei 19%, im Vergleich dazu lag sie bei den 41-60-jährigen bei 11% und bei denen über 60 Jahren bei 13%. Die genaue Ursache des

jugen Erkrankungsalters und der Aggressivität der vorgefundenen Tumore ist bislang nicht bekannt (Paiva, de Oliveira Araujo et al. 2015).

Was die Tendenz im Krankheitsauftreten betrifft, ist die ASR in den USA zwischen 1973-2002 (1973-1982 0,84/100.000, 1983-1992 0,69/100.000, 1993-2002 0,58/100.000) gesunken, während man in Dänemark und dem Vereinigten Königreich (UK) steigende Inzidenzen beobachtet (1979-2009 21% Inzidenzanstieg in UK) (Parkin and Bray 2006).

2.2. Ätiologie und Risikofaktoren

2.2.1 HPV-Infektionen

Schätzungsweise 15-20% aller menschlichen Tumore entstehen durch Infektionskrankheiten und circa 5% durch humane Papillomviren (HPV) (Mangino, Chiantore et al. 2016, Smola 2017). Die HPV-DNA Prävalenz bei den penilen Plattenepithelkarzinome beträgt in einer systematischen Review und Metaanalyse aus 52 Studien mit 4199 Patienten 50% (Olesen, Sand et al. 2019). Anders als beim Cervixkarzinom (Cervix-Ca), das zu über 99% mit HPV assoziiert ist, wird das Peniskarzinom in diesem Punkt eher mit dem Vulvakarzinom (Vulva-Ca), das zu 40-50% HPV positiv ist, verglichen (Nielsen, Holm-Nielsen et al. 2000). Dysplastische Vorstufen und Kondylome zeigen mit 90% und 100% HPV-Positivität eine signifikante Differenz im HPV-Status im Vergleich zu späteren penilen Tumoren (Rubin, Kleter et al. 2001). Eine Erklärung hierfür ist die „hit and run“-Hypothese, nach der HPV für die Initiation der Tumorgenese verantwortlich ist, aber im Laufe der Zeit durch das Immunsystem oder natürliche Mutationen in den viralen Genen eliminiert wird, die immortalisierte Zelle jedoch auch ohne das Virus weiterlebt (Nielsen, Holm-Nielsen et al. 2000, Brianti, De Flammineis et al. 2017). Das würde erklären, wieso nicht in allen Tumoren, in denen man einen HPV positiven Status erwarten würde, das Virus nachzuweisen ist. Klinisch wird zwischen high-risk(HR)-HPV-Typen, die mit der Entstehung diverser Tumore (Anogenital-, Kopf-Hals-, Cervixkarzinome) assoziiert sind, und low-risk(LR)-HPV-Typen, die eher in Genitalwarzen und anderen nicht-maligne (Vorläufer)Läsionen auftreten, unterschieden (zur Hausen 2002). Während die Kondylome hauptsächlich durch LR-HPV-Typen wie 6 und 11 ausgelöst werden, findet sich im Peniskarzinom am häufigsten hig-Risk Typen wie HPV16 (25-94,7%), 18 (10,5-55,4%) oder Mischinfektionen (Pow-Sang, Ferreira et al. 2010).

Zwischen den histologischen Subtypen zeigen sich signifikante Unterschiede im HPV-Status, so dass auch die WHO in ihrer aktuellen Klassifikation zwischen HPV-assozierten und nicht-HPV-assozierten Subtypen unterscheidet. So ist das gewöhnliche Plattenepithelkarzinom

(„usual type SCC“) als häufigster Subtyp des Peniskarzinoms nur bis zu 33% HPV-positiv, ähnlich den anderen keratinisierenden Tumorentitäten wie den verrukösen, papillären und pseudopapillären Peniskarzinomen mit 25-33%. Hoch positive Subtypen sind dagegen das basaloide, das warzige und das warzig-basaloide Peniskarzinom mit 75-100% HPV-Nachweis (Rubin, Kleter et al. 2001, Gross and Pfister 2004). Unbehandelte persistierende HPV-Infektionen können über eine Zeit von 20-30 Jahren in eine maligne Entartung übergehen (Schneede and Schlenker 2018).

Untersuchungen zur HPV-Prävalenz in verschiedenen Ländern und Populationen kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Gesamtprävalenz und ebenso in der Häufigkeit der einzelnen HPV-Typen. Hierbei sind unterschiedliche Detektionsmethoden und oftmals nur kleine Fallzahlen zu beachten. Eine HPV-Prävalenz von 30-80% je nach Sensitivität der Detektionsmethoden und den Subtypen der Testpopulation, mit der höchsten Inzidenz in Afrika, Südostasien, sowie Zentral- und Südamerika, wird in verschiedenen Studien beschrieben (Senba, Kumatori et al. 2006). Eine Untersuchung von 88 PeCa-Proben aus dem Norden Thailands wies durch in situ Hybridisierung in 53,8% und durch PCR in 81,5% der Proben HPV-DNA nach. Bemerkenswerterweise war in dieser Population HPV18 in 55,4% (32,3% Einzelinfektion, 31,1% Mischinfektion) und HPV6 in 43,1% (24,6% Einzelinfektion, 18,5% Mischinfektion) der Fälle am meisten vertreten (Senba, Kumatori et al. 2006).

Eine systematische Übersicht und Metanalyse aus 20 Studien mit 649 Patienten zum Status von HPV-DNA und p16 in Tumoren, verglich das Überleben von den Positiven mit dem der Negativen (Sand, Rasmussen et al. 2018). Patienten mit HPV-DNA oder p16-Surrogatmarker positiven Tumoren zeigten ein signifikant besseres krankheitsspezifischen Überleben (DSS) als jene die negativ getestet wurden. Hieraus wurde abgeleitet, dass die standartmäßige Testung auf HPV-DNA und p16-Überexpression von der Diagnostik in die weitere Therapieplanung und die Nachsorge miteinfließen sollte (Sand, Rasmussen et al. 2018).

2.2.2 Phimose

Bei der Phimose handelt es sich um eine angeborene oder erworbene Verengung der Vorhaut. Im Säuglings- und Kleinkinderalter ist sie noch physiologisch. Sofern sie asymptomatisch ist und sich spätestens bis zum Abschluss der Pubertät zurückbildet, besteht kein Therapiebedarf. Durch manuelle Manipulation der verengten Vorhaut können Risse und Strikturen mit chronischen Entzündungen auftreten, die zu weiterem Verlust der Retrahierbarkeit beitragen. Durch die Retention von Urin, Smegma und Sperma werden Infektionen begünstigt und es kann zu akuten, sowie chronischen Balanitiden/Balanoposthitiden kommen. Dazu wird die

Genitalhygiene erschwert und man geht davon aus, dass die Suszeptibilität für HPV-Infektionen steigt (Tseng, Morgenstern et al. 2001, Horenblas, Kroon et al. 2008).

Das Fehlen einer neonatalen Zirkumzision wird als stärksten Risikofaktor für das Auftreten des PeCa betrachtet. In einer Fall-Kontrollstudie (Maden, Sherman et al. 1993) konnte eine Risikoerhöhung um das 3,5-fache für unbeschnittene Männer, deren Vorhaut nicht retrahierbar war, gezeigt werden. Das Risiko für die Entwicklung eines PeCa erhöht sich um 3,2- bei unbeschnittenen Männern und um 3,0-fache bei Männern, die nach der Neonatalperiode beschnitten wurden. Das Auftreten von Smegma wurde mit einer Risikoerhöhung um 2,1-fache angegeben (Maden, Sherman et al. 1993).

Die Datenerhebung einer Fall-Kontrollstudie untersuchte in diesem Zusammenhang das Auftreten von invasive PeCa, sowie Carcinoma in situ (CIS). Eine Phimose in der Patientengeschichte war stark mit einem invasiven PeCa verbunden (OR=16), nicht aber mit dem CIS (OR=1,7) (Tseng, Morgenstern et al. 2001). Die neonatale Zirkumzision war umgekehrt mit einer Risikoreduktion für das invasive PeCa (OR=0,41), nicht aber beim CIS zu erkennen. Schränkte man die Betrachtung auf Männer ohne eine früher bestehende Phimose ein reduzierte sich die Assoziation mit einem invasiven Karzinom (OR=0,79). Sie schlossen daraus, dass sich der protektive Effekt der Zirkumzision für das PeCa, zu großen Teilen aus dem Verlust von möglichem tumorbildenden Gewebe ergibt (Tseng, Morgenstern et al. 2001).

Eine weitere Fall-Kontrollstudie von Daling und Kollegen zur Ätiologie des Peniskarzinoms zeigte ebenfalls, dass eine bestehende Phimose einen unabhängigen Risikofaktor darstellt und die neonatale Zirkumzision einer Risikoreduktion gleichkommt (Daling, Madeleine et al. 2005). Das Risiko an einem Peniskarzinom zu erkranken war für nicht beschnittene Männer erhöht (OR=2,3), nicht aber für die Entwicklung eines CIS (OR=1,1). 35% der Männer mit invasivem PeCa, die nicht in der Kindheit beschnitten wurden hatten eine Phimose in der Vorgeschichte, im Vergleich zu 7,6% der Kontrollgruppe (OR=7,4). Bei Männern ohne Zirkumzision in der Kindheit war eine Phimose stark mit der Entwicklung eines PeCa assoziiert (OR=11,4). Limitierte man die Auswertung auf jene Männer mit invasivem PeCa ohne eine Phimose in der Vorgeschichte bestand keine Risikoerhöhung (OR=0,5) (Daling, Madeleine et al. 2005).

Die Prävalenz der Phimose liegt zwischen 8-23% (Minhas, Manseck et al. 2010). Die Zirkumzision reduziert die Oberfläche des nicht verhornenden Plattenepithels der Haut des Penis um 50%. Die Lokalisation des Peniskarzinoms wird zwischen 13,2-21% ausschließlich am Präputium und zu 9% an Glans und Vorhaut zusammen angegeben (Pow-Sang, Ferreira et

al. 2010, Sohn, Dietrich et al. 2018). Die Risikoreduktion durch die Zirkumzision erklärt sich wahrscheinlich zum einen pragmatisch aus der Tatsache, dass die Gewebefläche aus der ein PeCa entstehen kann, reduziert wird und zum anderen durch die Reduktion der Folgen einer potenziell auftretenden Phimose. So reduziert sich die Wahrscheinlichkeit peniler Traumata durch gewaltsame Retraktion, die chronische Inflammation durch das infektionsbegünstigende Mikromilieu und die Wahrscheinlichkeit einer HPV-Infektion (Colberg, van der Horst et al. 2018).

2.2.3 Chronische Inflammation

Chronisch-entzündliche Erkrankungen wie die Balanitis/Balanoposthitis, sowie die genitale Form des Lichen sclerosus, die Balanitis xerotica obliterans wurden in mehreren Studien als Risikofaktor für die Entstehung des Peniskarzinoms belegt. Im Konzept der bimodalen Karzinogenese stellt die chronische Inflammation den zweiten Arm neben der HPV-induzierten Tumorgenese ein (Erbersdobler 2018).

Der Lichen sclerosus (LS) ist eine systemische, chronisch-entzündliche, nicht-infektiöse Dermatose unklarer Genese mit anogenitaler (Vulva, Penis, perianal Region) oder extragenitaler (Unterarm, Rücken) Lokalisation. Kennzeichnend sind die namensgebenden weiß-grauen, unregelmäßigen Plaques. Die Balanitis xerotica obliterans ist die atrophische mukokutane Form, die das Genital betrifft. Mögliche Symptome sind Schmerzen, Pruritus, mangelnde Retrahierbarkeit der Vorhaut und damit verbunden Dyspareunie, Dysurie und Algurie (Velazquez and Cubilla 2003). Sowohl für die Entstehung des Vulva-Ca als auch des PeCa stellt der LS ein signifikantes Risiko dar, denn 5-10% der Patienten mit dieser Präkanzerose entwickeln diese Tumore (Cubilla, Velazquez et al. 2004, Horenblas, Kroon et al. 2008). Weitere inflammatorisch wirkende Präkanzerosen sind die Erythroplasie Queyrat, der Morbus Bowen, die bowenoide Papulose.

Die Angaben zur Risikoerhöhung schwanken zwischen den Autoren. Maden und Kollegen schreiben der Balanitis und urethralen Strikturen neben der oftmals auslösenden Phimose, auch davon unabhängig eine Risikoerhöhung um 1,3- und 1,5-fache zu (Maden, Sherman et al. 1993). Madsen und Kollegen geben in ihrer univariaten Risikofaktor-Analyse für die Balanitis eine signifikante Assoziation (OR=3,07) mit dem penilem SCC an, während sie in der multivariaten Analyse ihre statistische Signifikanz verliert (OR=2,37) (Madsen, van den Brule et al. 2008). Hakenberg und Kollegen geben für die Balanoposthitis eine HR von 9,5 an (Hakenberg, Drager et al. 2018).

2.2.4 Traumatische Läsionen

Patienten mit traumatischen Läsionen wie Verletzungen und länger andauernden Veränderungen des Penis zeigen ebenso wie Patienten mit chronischer Inflammation ein erhöhtes Risiko für ein invasives Peniskarzinom (Maden, Sherman et al. 1993). In Rahmen einer Fall-Kontrollstudie zeigten Patienten mit einer chronischen Dermatitis oder einem Exanthem über die Dauer von mindestens einem Monat ein 9,4-fach höheres Risiko gegenüber Patienten ohne solch eine Vorgeschichte. Beschränkt man die Betrachtung auf Patienten mit einem Exanthem, ohne diagnostizierte Genitalwarzen erhöhte sich dies weiter auf das 11,5-fache Risiko. Kleine Einrisse oder Abschürfungen des Penis waren mit einem 3,9-fach erhöhten Risiko im Vergleich zu Patienten ohne solche Verletzungen verbunden. Beschränkt man die Betrachtung abermals auf Patienten ohne Genitalwarzen bleibt die Risikoerhöhung allerdings hier nahe zugleich hoch (RR=3,8) (Maden, Sherman et al. 1993).

Eine weitere Fall-Kontrollstudie von Daling und Kollegen zu verschiedenen penilen Verletzungen zeigte, dass Einrisse der Vorhaut und des Frenulums (OR=5,2), Exantheme des Penis im Sinne einer chronischen Dermatose über mindestens einen Monat (OR=14,9), penile Inflammation (OR=3,5), penile Verletzungen wie Verbrennungen oder Verbrühungen und urethrale Strikturen (OR=2) eine Risikoerhöhung darstellen. In einem multivarianten Model mit diesen 5 Faktoren waren nur penile Einrisse, Exantheme und Verletzungen mit einem erhöhten Risiko verbunden (Daling, Madeleine et al. 2005). Ähnliche Beobachtungen konnten auch retrospektiv bei penilen Verletzungen über 2 Jahren vor Diagnose für das CIS (OR=23) und für das invasive PeCa (OR=4,6) gemacht werden. 23% der CIS und 12% der invasiven PeCa Fälle hatten in der Vergangenheit Schnitte, Verbrennungen oder andere Wunden des Penis, in der Vergleichsgruppe waren es nur 2% (Tseng, Morgenstern et al. 2001).

2.2.5 Nikotinabusus

Die Hypothese der durch das Rauchen beeinflussten Karzinogenese stützt sich darauf, dass Noxen-bedingte Schäden nicht nur an den Lokalisationen des Körpers, die mit dem Rauchinhalat in Berührung kommen, eintreten, sondern auch abseits davon, durch den Eintritt in den Blutkreislauf. Nikotin und Cotinin akkumulieren mit steigendem bzw. dauerhaftem Konsum in zervikaler Mukosa und in penilen Sekreten (Horenblas, Kroon et al. 2008). So könnte eine initial angestoßene Karzinogenese durch HPV später unabhängig davon durch diese chemische Kanzerogene vorangetrieben werden. Andererseits kommt es durch den Tabakkonsum zu einer reduzierte Immunfunktion, beispielsweise der Abnahme von Langerhans-Zellen des Cervix-Epithels. So erhöht sich das Risiko für eine HPV-Infektion, da

eine kompromittierte Immunreaktion und virale Elimination im Vergleich zu nicht Rauchern vorliegt. (Tseng, Morgenstern et al. 2001)

In der Fall-Kontroll-Studie von Tseng und Kollegen zeigten Patienten, die jemals geraucht haben eine Risikoerhöhung um 2,4-fache, im Vergleich dazu hatten Exraucher ein 1,6-fach und aktiven Rauchern 3,1-fach erhöhtes Risiko (Tseng, Morgenstern et al. 2001). Das Risiko erhöhte sich mit der konsumierten Menge und reduzierte sich bei sinkendem Konsum umgekehrt auch wieder (1-20 Zigaretten/d (CIS OR=2,7; invasives PeCa OR=2,3); >20 Zigaretten/d (CIS OR=7,1, invasives PeCa OR=4,2; Reduktion des Konsums bei 1-30 PY (OR=1,8), >30 PY (OR=2,9)). Insgesamt lässt sich parallel zum Cervix-Ca eine zwei-, dreifache Risikoerhöhung durch das Rauchen feststellen (Pow-Sang, Ferreira et al. 2010). Auch für Kautabak wurde diese Assoziation gezeigt (Minhas, Manseck et al. 2010).

2.2.6 PUVA-Therapie

Hierbei handelt es sich um eine Kombinationstherapie mit Topika der Psoralen-Gruppe und UV-A-Phototherapie, die vor allem in der Dermatologie bei Fällen von Psoriasis, kutanen T-Zell-Lymphomen, Hand-/Fußekzemen und Vitiligo eingesetzt wird. (Parrish, Fitzpatrick et al. 1974). Auf Grund erheblicher Nebenwirkungen wie der Risikoerhöhung für Plattenepithel (SCC)- und Basalzellkarzinom (BCC), gilt hier eine strenge Indikationsstellung

In einer groß angelegten prospektiven Kohortenstudie mit 1380 Psoriasis-Patienten, von denen 759 Patienten bis Studienende (1975/76-2005) überlebten, als Erster auch ein erhöhtes Risiko für das penile SCC (Stern 2012). 283 (87%) entwickelten ein oder mehr NMSC (nonmelanoma skin cancer) während einer durchschnittlichen Nachbeobachtungszeit von 27 Jahren. Bei 351 von 1380 Patienten (25%) wurden 2973 SCCs diagnostiziert, 330 (24%) zeigten 1729 BCCs und 198 hatten SCCs und BCCs. Die Tumorinzidenz für das SCC war auf eine Vergleichsgruppe der amerikanischen Bevölkerung gleichen Alters, Geschlechts und Ethnie bezogen 30-fach höher. Jeder betroffene Patient entwickelte durchschnittlich 8,5 SCCs, die BCC Inzidenz war 5-fach höher als in der Normalbevölkerung. Im Vergleich waren SCCs zu BCCs zahlenmäßig im Verhältnis 1,7:1 häufiger und die Inzidenz würde umgerechnet auf die Normalbevölkerung 10.000/100.000 betragen. Die Applikation von über 350 PUVA-Therapien steigerten das SCC-Risiko maßgeblich, weniger als 150 Therapien hatten einen mäßigen Effekt für das SCC Risiko, während die Inzidenz des BCC weniger stark beeinflusst wurde. Vergleicht man die Anzahl der Applikationen (350-450 vs. <50) beträgt die Inzidenzratenerhöhung (IRR) für das SCC 6,01. Das SCC-Risiko unter langer oder hochdosierter PUVA-Therapie sollte

deshalb bedacht, Kontrollen der Haut und Patientenschulung dahingehend durchgeführt und die Therapieoption als solches sorgfältig abgewogen werden (Stern 2012).

2.2.7 Hygiene, Promiskuität, Geschlechtserkrankungen

Die verfügbare Datenlage zur Verbindung zwischen peniler Hygiene und PeCa ist schwach. Frühere Überlegungen zur Karzinose des PeCa waren, dass schlechte Hygiene mit einer Ansammlung von Smegma einhergeht, welches selbst onkogenes Potential besitzt. Den zugrundeliegenden Studien an Mensch und Tier, auf denen diese Thesen fußen, basierten häufig auf religiösen Vorurteilen, Stereotypen gegenüber ärmerer Bevölkerung und zeigten eine mangelhafte Methodik und Durchführung. Aus Untersuchungen an nicht repräsentativen Patientenkollektiven wurde so auch geschlussfolgert, dass der Grund für die verminderte PeCa-Inzidenz bei Patienten mit früherer Zirkumzision war, dass sich dadurch auch das auslösende Smegma reduziere. Die aktuelle Datenlage zeigt keinerlei wissenschaftliche Evidenz für ein onkogenes Potential von Smegma (Van Howe and Hodges 2006).

Die Übertragung von HPV erfolgt durch Sexualverkehr und Schmierinfektionen, so dass das Risiko für die Entwicklung eines PeCa um das Drei- bis Fünffache durch multiple Sexualpartner und frühen ersten Geschlechtsverkehr steigt (Schlenker and Schneede 2019).

In der Studie zur Ätiologie des Peniskarzinoms wurde ebenfalls der Zusammenhang zu sexuell übertragbaren Erkrankungen, Sexualverhalten und Hygiene untersucht. Die Anzahl der Sexualpartner und das Alter beim ersten Geschlechtsverkehr waren mit dem PeCa assoziierte Risikofaktoren (Tseng, Morgenstern et al. 2001). Diese Assoziation war weitestgehend nicht mehr zu beobachten, wenn man Infektionen und anderen Prädiktoren aus dem Kernmodell der Studie ausklammerte. Wenig oder gar kein Effekt auf die Entstehung des PeCa wurden bei der Häufigkeit des Badens, den Waschmethoden des anogenitalen Bereichs direkt vor und nach dem Geschlechtsverkehr und der Exposition gegenüber aromatischen polyzyklischen Kohlenwasserstoffen (Druckertinte, Teer, Kohle), Schmiermittel, Petroleum, Asbest und Fieberglas beobachtet. Patienten mit Genitalwarzen die ≥ 2 Jahre vor Diagnose aufgetreten sind hatten sowohl für das CIS (OR=1,7) als auch das invasive Karzinom (OR=3,7) ein erhöhtes Risiko. Das Risiko von Patienten mit Parasitose (Enterobiasis OR=1,8), Gonorrhö (OR=2,3) oder Ausschlägen der Haut des Beckens (OR=1,3) in der Vorgeschichte war zwar >1 aber nicht signifikant. Es wurde keine Assoziation zu anderen Erkrankungen wie Syphilis, Herpes genitalis, Trichomonaden-Infektion, Chlamydien oder anderen Urethritiden festgestellt.

2.3 Präkanzerosen und Carcinoma in situ

Das SCC entwickelt sich oftmals aus vorbestehenden Läsionen, die früher üblich als homogene Gruppe an Präkanzerose verstanden wurden, heute jedoch eher nach der jeweiligen Pathogenese eingeteilt werden. Hierbei stehen vor allem 2 treibende Faktoren in der Tumorgenese im Vordergrund: HPV-Infektionen und chronische Inflammation. HPV-assoziierte Läsionen (Buschke-Löwenstein-Tumor, Bowenoide Papulose, M. Bowen, Erythroplasia de Queyrat), chronische inflammatorische Erkrankungen (Lichen sclerosus des Penis, peniles Horn, Leukoplakie, pseudoepitheliomatöse/keratogene/glänzende Balanitis) und die penilen intraepitheliale Neoplasie (PIN) vom differenzierten, warzigen und basaloiden Subtyp stellen die wichtigsten Identitäten der Präkanzerosen und Carcinoma in situ dar (Amin, Griffith et al. 2014).

Die hohe Kontagiosität, sowie die rasche Verbreitung von HPV durch Sexualkontakte verursacht, vor allem in Ländern mit prekären hygienischen Verhältnissen, geringer Aufklärung und fehlender Verfügbarkeit von Impfungen eine hohe Anzahl an potenziell gefährdeten Menschen. Dazu kommen späte Erstdiagnosen aus Scham, mangelnder fachlicher Expertise bei der Untersuchung oder unzureichend medizinischer Versorgung. Es ist anzunehmen, dass in Ländern mit einer hohen Impfquote gegen HPV, nicht nur die Fallzahl der Feigwaren und Cervix-Karzinome zurückgeht, sondern auch die der Präkanzerosen des PeCa (Arbyn, Xu et al. 2018, Schneede and Schlenker 2018, Schneede and Schlenker 2018)

2.3.1 Lichen sclerosus (et atrophicus), Balanitis xerotica obliterans

Lichen sclerosus (LS) ist eine inflammatorische Hauterkrankung unklarer Genese, die für gewöhnlich die Anogenitalregion betrifft. Männer sind zwischen 3- bis 10-mal seltener betroffen als Frauen. Während Frauen meist postmenopausal und mit zunehmendem Alter, sowie vor Eintritt der Pubertät erkranken, steigt bei Männern die Inzidenz nach der Pubertät, mit einer Verdoppelung in der 3. Lebensdekade und fällt nach dem 60 Lebensjahr ab. In einer US-amerikanischen epidemiologischen Studie wurde beschrieben, dass Afroamerikaner und Hispanics zweimal häufiger erkranken als Weiße. Eine infektiöse Genese durch beispielsweise *Borrelia burgdorferi* oder HPV wurde zwar vermutet, bisher gibt es hierfür jedoch keine Beweise. Bei weiblichen Patienten zeigen sich klinisch Juckreiz und Schmerzen, während bei Männern Dysfunktionen der Miktion und beim Geschlechtsverkehr im Vordergrund stehen. Die Primärläsionen sind flache bis erhabene elfenbeinfarbene Papeln, die zu hyperkeratotischen und atrophischen Plaques konfluieren, auch Depigmentierung der Haut, Fissuren, Purpura und Ekchymosen treten regelhaft auf. Bei männlichen Patienten ist in der Regel die Glans penis

und/oder die Vorhaut betroffen, hierbei können sich chronisch Phimosen und Strikturen ausbilden. Die Diagnose erfolgt meist klinisch, allerdings oft verzögert durch fehlende Expertise oder späte ärztliche Vorstellung auf Grund von Schambehaftung oder auch asymptomatischen Verläufen in ca. 10% der Fälle (Kirtschig 2016). In Einzelfällen mit unklarem Befund, fehlgeschlagener Erstlinientherapie oder Malignomverdacht ist auch eine Biopsie gängig. Histologisch zeigen sich Orthohyperkeratosen, epidermale Atrophie, Basalzelldegeneration und bandförmige Lymphozyten-Infiltrate. Frühe Therapie kann zur Ausheilung führen, Komplikationen wie Vernarbungen mit Dysurie und Dyspareunie verhindern und möglicherweise sogar das Risiko maligner Entartung senken. Der Goldstandard sind potente bis hochpotente topische Steroide in Salbenform (Clobetasol, Mometason), milde oder moderate Erkrankungen können bei Jungen und Männern durch Zirkumzision geheilt werden. Eine Nachsorge nach Therapieabschluss ist zu empfehlen, da bis zu 5 Jahre danach Rezidive auftreten können. Ähnlich wie beim Peniskarzinom konnte auch hier beobachtet werden, dass überwiegend Unbeschnittene oder erst später im Leben Beschnittene erkranken, während sie bei Menschen mit Zirkumzision im Kindesalter eine Rarität ist. Das Lebenszeit-Risiko der Entwicklung eines SCC der Genitalregion ist ca. 4-5% gegenüber Gesunden erhöht. Der Pathomechanismus der malignen Entartung ist nicht bekannt, wobei der Einfluss von p53 Alteration, chronischer Inflammation und oxidativer DNA-Schädigung angenommen wird (Kirtschig, Becker et al. 2015, Kirtschig 2016)

2.3.2 M. Bowen

Der Morbus Bowen stellt ein Carcinoma in situ des Plattenepithelkarzinoms dar und kann praktisch an allen mukokutanen Arealen, inklusive dem Nagelbett, auftreten. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter, mit einem medianen Diagnosealter in der 6-8. Lebensdekade. Männer und Frauen erkranken nahezu gleich häufig. Ätiologisch werden ähnliche Faktoren wie bei anderen nicht-melanösen Hauttumoren beschrieben: UV-Strahlung, chemische Noxen wie Arsen-Verbindungen und Infektionen wie bspw. durch HPV. Durch in situ Hybridisierung und PCR-Analysen von Proben wurde häufig HPV16, aber auch HPV2 nachgewiesen. Klinisch stellt sich die Primärläsion meist als isolierte, gut abgrenzbare, schuppige Plaque mit erythematöser Basis dar, die zwischen ein paar Millimetern und mehreren Zentimetern im Durchmesser misst. Die Differentialdiagnose zu Ekzemen, Psoriasis, Lichen simplex chronicus, aktinischer Keratose, bowenoide Papulose, und verrukösen, sowie invasiven Karzinomen ist oft nicht einfach. Durch die langsame asymptomatische Größenzunahme und nicht zuletzt, Schambehaftung bei Lokalisation am Genital, erfolgt die Diagnose oft verzögert erst nach 5-8

Jahren (Bakardzhiev, Chokoeva et al. 2015). Histopathologisch zeigt sich eine akanthotisch veränderte Epidermis mit verlängerten und ausgedünnten Papillarkörpern. Das Stratum corneum zeigt wiederum Para- und Hyperkeratosen. Durch die ganze Epidermis hindurch zeigen sich Mitosefiguren der Keratinozyten, sowie ein Verlust der Reifung und Polarität, auch Vakuolisierung und lymphatische Infiltrate sind zu beobachten. Die Therapie erfolgt durch chirurgische Exzision mit ausreichendem Sicherheitsabstand und einer Tiefe bis ins subkutane Fettgewebe, um eine mögliche invasive Läsion in toto zu entfernen. Auch andere ablativ Optionen wie Kryotherapie und Laserablation mittels Nd:YAG- oder CO₂-Lasern oder topische Therapeutika wie 5-FU werden verwendet (Bakardzhiev, Chokoeva et al. 2015).

2.3.3 Bowenoide Papulose

Die Bowenoide Papulose (BP) ist eine seltene sexuell übertragbare Erkrankung, die bei beiden Geschlechtern zu beobachten ist, und vor allem sexuell-aktive Menschen zwischen der 3. und 5. Lebensdekade betrifft. Die Klassifikation als eigenständige Erkrankung erwies sich als kompliziert, da eine Abgrenzung zum M. Bowen und der Erythroplasia de Queyrat nicht einfach ist. Ätiologisch scheint die Krankheit ihren Ursprung in einer persistierenden Infektion mit HPV zu haben. Der am häufigsten nachgewiesene HPV-Typ ist 16, aber auch andere Genotypen (18, 31, 33, 34, 35, 39, 42, 48, 51, 52, 53, 54) wurden beobachtet. Pathophysiologisch ist auch hier eine E6 und E7 induzierte Überexpression von p16, sowie der reversen Transkriptions-Telomerase (TERT/hTERT) zu finden. Dazu scheinen Immunsuppression und Nikotinabusus Risikofaktoren zu sein. Klinisch zeigen sich im Anogenitalbereich einzelne oder multiple hautfarbene Papeln verschiedener Form unter einem Zentimeter Größe, die über Wochen bis Jahre bestehen können. Meist treten diese am Penis auf; Vorhaut, Glans, Skrotum und Anus können aber auch betroffen sein. Auf Grund des Potentials zur Entartung sollte eine Hautbiopsie durchgeführt werden, ebenso kann eine HPV-Typisierung sinnvoll sein. Meist sind die Hauterscheinungen asymptomatisch, Pruritus und Intertrigo können allerdings auch beobachtet werden. Histologisch zeigt sich eine Akanthose und Atypien durch die gesamte Epidermis. Multiple Metaphasen-Mitosefiguren oberhalb der intakten Basalzellschicht und mehrkernige Keratinozyten mit Pleomorphismen werden beobachtet. Die Therapie erfolgt in der Regel konservativ, da ein spontaner Rückgang der Hauterscheinungen bei Immunkompetenten innerhalb von 8 Monaten häufig ist. Ablative und destruktive Therapien wie Kryotherapie, Elektrokoagulation, CO₂-Laserevaporation, Phototherapie mit 5-Aminolävulinsäure (ALA) sowie topische Anwendungen mit 5-FU und Imiquimod-Creme sind möglich (Chamli and Zaouak 2021).

2.3.4 Erythroplasia de Queyrat

Erythroplasia de Queyrat (EQ) ist ein intraepidermales Carcinoma in situ. 80-90% der Fälle treten bei unbeschnittenen Männern auf. Klinisch präsentiert es sich als langsam progrediente scharf abgrenzbare, leicht erhabene erythematöse Plaque der Glans oder des inneren präputialen Blattes der Vorhaut, die durch Ausfluss, Blutungen, Schmerzen und Ulzerationen apparent werden kann. Diagnostisch sollte eine Dermatoskopie erfolgen, dabei zeigen sich strukturlose pinke Areale mit Clustern von glomerulären Gefäßen, sowie Schuppung, Vernarbungen und Erosionen. Auf Grund des Risikos zum Übergang in ein invasives SCC von 10-33% sollte nach Diagnosestellung auch eine Therapie erfolgen. Eine lokale Exzision sollte möglichst gewebeschonend bei maximaler chirurgischer Rezidivprophylaxe erfolgen, hier hat sich die mikroskopisch kontrollierte Chirurgie nach Moh (MMS) etabliert. Daneben sind ebenfalls ablativ Verfahren, photodynamische Therapie (PDT) und topische Applikationen (Imiquimod Creme, Isotretinoin, 5-ALA bei PDT) mögliche Optionen (Fanning and Flood 2012, Iafrate, Mancini et al. 2020).

2.3.5 Buschke-Löwenstein Tumore

Der Buschke-Löwenstein Tumor (BLT) oder auch Riesenkondylom und Condylomata acuminata gigantea genannt, ist ein lokal verdrängender, destruktiv wachsender Tumor. Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 46,5 Jahre, wobei die Veränderungen im Median dabei seit 5 Jahre bestehen. Männer sind mit einer Ratio von 2,4:1 häufiger betroffen. Ätiologisch liegen dem BLT wie den gewöhnlichen Feigwarzen auch eine HPV-Infektion, meist durch HPV6 und 11, zu Grunde, wobei die Infektion wahrscheinlich bis zur Entwicklung mehr als 10 Jahre persistieren muss. Über diese Zeit kann eine Akkumulation diverser Mutationen im Genom der infizierten Stellen stattfinden, bis eine ungehemmte maligne Proliferation einsetzt. Verlust der Heterozygotie, Mikrosatelliteninstabilität im Bereich des Tumorsuppressors CDKN2a, sowie Deletionen in p53 wurden bereits nachgewiesen. Lokale oder systemische Immunsuppression kann diesen Prozess beschleunigen. Klinisch unterscheidet sich das BLT von den Condylomata acuminata zum einen durch seine Größe, aber auch durch Wachstum, das nicht nur exo- sondern auch endophytisch erfolgt, weswegen auch auf mögliche Gewebsinvasionen zu achten ist. Lokalisiert sind die Tumore meist am Genital, dem Perineum oder perianal, auch ein Wachstum intraurethral und intraanal ist beschrieben. Neben den Symptomen, die sich durch die lokale Destruktion ergeben, kann es auch zu oberflächlichen Blutungen und fötidem Ausfluss kommen. Diagnostisch sollte eine Biopsie mehrerer Areale erfolgen, da der Tumor makroskopisch, wie mikroskopisch

inhomogene Binnenarchitektur mit subklonalem Tumorwachstum aufweisen kann. Koilozyten können als Zeichen der viralen Infektion gefunden werden, sind aber nicht obligat im gesamten Tumor zu finden. Je nach Studie wird eine Invasivität in 10-50% der Fälle beschrieben. Die favorisierte Therapie ist die organerhaltende, operative Entfernung in sano, wobei auch hier mit Elektrokauterisation, CO₂-Laserablation und Angioembolisation als Hilfsmittel gearbeitet werden kann. Eine Radiochemotherapie zur alleinigen Therapie oder als Downstaging für eine spätere OP können angewendet werden, wobei eine Radiotherapie auch eine Transformation in einen anaplastischen Tumor auslösen kann. Eine Nachbehandlung mit Imiquimod-Creme zur Rezidivprophylaxe kann sinnvoll sein. Auf Grund des seltenen Auftretens des Tumors, gibt es keine kontrollierten Studien zu verschiedenen Therapie-Regimen. Die Mortalität wird mit ca. 20% angegeben (Sporkert and Rubben 2017).

2.3.6 Extramammärer M. Paget

Der M. Paget (MP) ist eine chronische ekzematöse Erkrankung der Haut, in der Regel der Mamille und Areola mammae mit einem darunterliegenden intraduktalen Karzinom der Glandula mammaria. Die extramammäre Form (EMP) ist eine seltene Entität und teilt die Eigenschaft der epidermalen Paget-Zellen, tritt jedoch in verschiedenen anatomischen Lokalisationen und mit verschiedener Histopathogenese auf. Die Erkrankung betrifft meistens Kaukasier und tritt abhängig von der Lokalisation in einer Altersspanne zwischen 45 bis 75 Jahren auf, wobei bei peniler und skrotaler Form ein spätes Auftreten in der 7 Lebensdekade beschrieben wird. Zwischen kaukasischer und asiatischer Population besteht ein reverses Verhältnis bei der Geschlechterverteilung, während im Westen mehr Frauen als Männer betroffen sind (1:2-7), sind in Asien mehr Männer betroffen (1:3,5). Klinisch präsentiert sich das EMP fokal oder multifokal im Bereich apokriner Drüsen der Leiste oder der Axilla als vielgestaltige zirkumskripte erythematöse oder leukoplastische Plaques, gelegentlich als hypo- oder hyperpigmentierte Makula. Blutungen, Ulzerationen, harte Noduli und lokale Lymphadenopathie können auftreten. Symptomatisch stehen Pruritus, Brennen, erhöhte Dolenz und Ödeme im Vordergrund, wobei 10% der Patienten asymptomatisch bleiben. Diagnostisch sollte eine Probe mittels Punch Biopsie entnommen werden, hier zeigen sich epitheliale Zellen mit reichlich Muzin-haltigem Zytoplasma und pleomorphen/hyperchromatischen Zellkernen. Verschiedene histologische und immunohistochemische Färbungen (CEA, CK7, EMA, HER2/neu, ki67, p53, PAS, S100) erweisen sich in der Differentialdiagnostik als sinnvoll, außerdem ist zu beachten, dass bereits eine Mikroinvasion zur Entwicklung von Lymphknotenmetastasen führen kann. Es existieren aktuell keine empirischen Leitlinien zur

Behandlung des EMP, etabliert ist hier ebenfalls die mikroskopisch kontrollierte Chirurgie nach Moh (MMS). Die Prognose ist bei in der Epidermis lokalisierten Tumoren exzellent, bei Invasion der Dermis und potenzieller Fernmetastasierung verschlechtert sich die Prognose drastisch (St. Claire, Hoover et al. 2019).

2.3.7 Penile intraepitheliale Neoplasie (PIN)

PIN können in 5-15% der Fälle eine Transformation zu invasiven Karzinomen durchlaufen, in nahezu alle Tumoren gelingt ein HPV-DNA Nachweis. Die Dauer zwischen der Entstehung der PIN-Läsion und der Entwicklung eines infiltrierenden Tumors beträgt ca. 10-15 Jahre. Die Majorität dieser Läsionen entwickelt sich im Sulcus von Glans und Vorhaut. Die eventuelle Infiltration verläuft parallel zum PeCa in die regionalen inguinalen und später in die pelvinen Lymphknoten, Skip-Metastasen kommen praktisch nicht vor. Dabei macht das Plattenepithelkarzinom als spätere Tumorentität 95% der malignen Tumore des Penis aus, die restlichen 5% sind andere Tumore der Haut (Melanome oder BCC) oder des Weichgewebes (Sarkome).(Horenblas, Kroon et al. 2008).

2.4 TNM-Klassifikation, Grading, Histopathologie und Subtypen-Einteilung

2.4.1 TNM-Klassifikation

Die aktuelle 8. Auflage der TNM-Klassifikation des Peniskarzinoms der Internationale Vereinigung gegen Krebs (UICC) aus dem Jahr 2016 hat das Staging des Peniskarzinoms in einigen Punkten wesentlich verändert. Eine Besonderheit ist, dass das Grading hier direkt in die TNM-Klassifikation einfließt. Das T1-Stadium mit der subepithelialen Gewebeeinfiltration wird hierbei in 2 unterschiedliche Risikogruppen unterteilt. Die Unterscheidungskriterien sind hierbei lymphovaskuläre Infiltration und eine schlechte Differenzierung ($\geq G3$), da beide wichtige prognostische Faktoren darstellen. Ist einer der beiden Faktoren gegeben liegt ein T1b- und kein T1a-Stadium vor. Das T2-Stadium liegt bei einer Infiltration in das Corpus spongiosum und T3-Stadium bei einer Infiltration der Corpora cavernosa penis vor. In der 7. Auflage beinhaltete das T2-Stadium die Infiltration von Corpus spongiosum und/oder der Corpora cavernosa penis, während T3 die Invasion der Urethra bedeutete. Zur Infiltration der Penisschwellkörper muss der Tumor die natürliche Barriere der Buck-Faszie und Tunica albuginea penis durchbrechen. Das Stadium T4 bedeutet die Infiltration anderer angrenzender Strukturen (Hakenberg, Compérat et al. 2014, Hakenberg, Compérat et al. 2018, Sohn, Dietrich et al. 2018). In einer späten sehr fortgeschrittenen Phase kann es auch zur Autoamputation des Penis kommen (Erbersdobler 2018).

Dem Lymphknoten-Status kommt eine besondere Aufmerksamkeit zu, da dieser wahrscheinlich den wichtigsten Prognosefaktor darstellt (Horenblas, Kroon et al. 2008). Das PeCa hat eine Tendenz zur frühen lymphatischen Metastasierung, diese folgt streng entlang der anatomischen Lymphabflusswege, wie durch frühere Lymphangiographie nachgewiesen werden konnte. Ausgehend vom Primärtumor des Penis erfolgt die Metastasierung in die oberflächlichen und tiefen inguinalen Lymphknoten, dies kann ipsilateral oder bilateral auftreten. Eine singuläre palpable mobile unilaterale inguinale LKM entspricht dem N1 und multiple palpable mobile unilaterale oder bilaterale inguinale LKM entsprechen N2. Von dort erfolgt die weitere Drainage ipsilateral in die jeweiligen pelvinen Lymphknoten. Fixierte uni- oder bilaterale Lymphknoten-Konglomeraten („bulky disease“) oder pelvine Lymphknotenadenopathie entsprechen N3. Bekannte Komplikationen stellen Ulzerationen der Haut mit anschließenden Infektionen oder größer werdende Blutungen durch Gefäßerosionen dar. Skip-Metastasen, die eine der natürlichen lymphatischen Drainagestationen überspringen, werden nicht beobachtet (Erbersdobler 2018, Hakenberg, Compérat et al. 2018).

Fernmetastasen sind selten und treten nur in späten Stadien auf. Es ist unüblich, dass diese ohne ausgedehnten lokoregionären Lymphknotenbefall auftreten. Eine Organmetastasierung tritt dabei in Lunge, Leber, Knochen und Gehirn auf (Pow-Sang, Ferreira et al. 2010).

2.4.2 EAU-Klassifikation und Grading

Das Grading des PeCa basiert größtenteils auf der Arbeit von Broders (1921) und schließt unter anderem Keratinisierung, nukleären Pleomorphismus und Mitose in seine Bewertung mit ein (Horenblas, Kroon et al. 2008). Zwar beinhaltet die aktuelle WHO-Klassifikation des PeCa das Grading, weltweit werden allerdings verschiedene Grading-Systeme genutzt. Die meisten Pathologen verwenden ein dreistufiges System (Velazquez, Ayala et al. 2008). Hierbei gilt es zu berücksichtigen, dass das Grading des PeCa als Plattenepithelkarzinom ohnehin komplexer ist als bei Adenokarzinom-Entitäten. Da sich die Differenzierung schon im Normalgewebe von der Basis bis zur Oberfläche im Rahmen der Keratinisierung stark verändert, bereitet es Schwierigkeiten die heterogenen Differenzierungsmuster, die auch im Tumor vorkommen von diesen abzugrenzen. Dies führt zusammen mit uneinheitlichen 3- und 4-Stufigen Gradingssystemen zu Problemen, die durch die neue TNM-Klassifikation entscheidenden Einfluss auf die Radikalität der Therapie haben (Erbersdobler 2018). Ein von der WHO erstelltes dreistufiges Model für das penile SCC beinhaltet zytologische Atypien, Keratinisierung, interzelluläre Brücken, mitotische Aktivität und Wachstumsverhalten am

Tumorrand. Zusätzlich wird darin noch das sarkomatoide PeCa unterschieden (Hakenberg, Compérat et al. 2018).

Deutsche sowie multinationale Studien zur Variabilität im Grading des PeCa zeigten trotz Befundung durch erfahrenen Pathologen mit uropathologischem Schwerpunkt mehrfach zwar eine stabil niedrige Intraobserver-, jedoch eine hohe Interobserver-Variabilität. Die Inklusion des histologischen Gradings in die TNM-Klassifikation erscheint deshalb in dieser Form nicht sinnvoll (Gunia, Burger et al. 2013, Kakies, Lopez-Beltran et al. 2014, Dorofte, Grelaud et al. 2021). Zu einem ähnlichen Schluss kommen auch Hölters und Kollegen, die die einzelnen Subtypen des penilen SCC verglichen haben und deren prognostischen Wert hervorheben. Weiter sind das Auftreten von LKM und lymphovaskulärer Invasion für die Autoren die wichtigsten Prognosemarker in der klinischen Entscheidungsfindung (Hölters, Khalmurzaev et al. 2019).

2.4.3 Histopathologie und Subtypen-Einteilung

Laut Bundesverband der deutschen Pathologen e.V. gibt es circa 1300 Pathologen in Deutschland, bezogen auf die Inzidenz des PeCa bedeutet dies, dass ein Pathologe rein statistisch nur alle 17 Monate ein Peniskarzinom sieht (Erbersdobler 2018).

Das SCC macht 95% der penilen Malignome aus, hierbei handelt es sich allerdings um eine heterogene Tumorentität mit vielen verschiedenen Sub- und Mischtypen. Andere Tumore sind noch seltener als das penile SCC, dabei handelt es sich meist um maligne Melanome, Weichteiltumore (Sarkome), Lymphome und Metastasen (meist Prostata-Ca oder kolorektales-Ca) (Hakenberg, Compérat et al. 2018). In 33-50% der Tumore ist eine HPV-Infektion nachweisbar, wobei die Inzidenz auf Grund von Merkmalen der Testpopulation (geographische, sozioökonomische und ethnische Unterschiede), dem vorliegenden Subtyp und den Detektionsmethoden stark schwankt. Assoziierte Läsionen (Lichen sclerosus, bowenoide Papulose) und Präkanzerosen (PIN, Buschke-Löwenstein Tumore, M. Bowen, extramammärer M. Paget) können regelhaft neben Tumoren in Biopsien auftauchen und sollten gesondert beachtet werden (Erbersdobler 2018, Hakenberg, Compérat et al. 2018).

In der WHO-Klassifikation wird zwischen HPV-assoziierten und nicht HPV-assoziierten Subtypen unterschieden. HPV-assoziiert sind das basaloide SCC, das papillär-basaloide Karzinom, das warzige (kondylomatöse) und warzig basaloide Karzinom, das Klarzell-Karzinom und das lymphoepitheliomähnliche Karzinom. Ohne oder mit geringer HPV-Assoziation sind das gewöhnliche SCC (NOS „not otherwise specified“), das

pseudohyperplastische Karzinom, das verruköse Karzinom, das papilläre Karzinom (NOS), das adenosquamöses Karzinom und das sarkomatoide Karzinom. Auch wenn der positive HPV-Status in systematischen Übersichtsarbeiten mit einem besseren Überleben verbunden war, gibt es sowohl bei den HPV-positiven Karzinomen deutlich aggressivere Entitäten (basaloides SCC: >50% died of disease - DOD), wie es bei den Negativen einige mit sehr guter Prognose (pseudohyperplastisches Karzinom: 0% DOD) gibt (Hakenberg, Compérat et al. 2018). Da es aktuell keine etablierten molekulardiagnostischen Parameter zur Prognose der Aggressivität, früher lymphogener Metastasierung und Rezidivrate gibt, ist die genaue Beurteilung der Subtypen-Einteilung und Infiltration ein essenzieller Schritt des klinischen Managements (Hölters, Khalmurzaev et al. 2019).

Das Plattenepithelkarzinom des gewöhnlichen Typs ist der häufigste Subtyp. Typischerweise ist ein signifikanter Teil HPV-negativ, zeigt aber TP53-Mutationen in der molekulargenetischen Untersuchung. 30% der Patienten versterben an der Tumorerkrankung (Erbersdobler 2018, Hakenberg, Compérat et al. 2018).

Das verruköse Karzinom ist eine gut differenzierte plattenepitheliale Neoplasie, typischerweise ohne HPV-Assoziation und negativem p16-Nachweis. Man kann es weiter in das rein verruköse Karzinom und das Carcinoma cuniculatum unterteilen. Die Prognose ist gut und es zeigt kein Metastasierungspotential. Aus diesem Grund sollte die Diagnose unter sorgfältigem Ausschluss von anderen exophytisch-wachsenden Tumoren wie dem papillären und kondylomatösen Karzinom sowie des Riesenkondyloms gestellt werden. Wichtiges Kriterium ist hierbei die Basis des verrukösen Karzinoms mit verdrängendem Wachstum und fehlendem netzartig-infiltrativem Muster. Dieses Wachstumsverhalten setzt sich bis in das tief-infiltrierende Carcinoma cuniculatum fort (Erbersdobler 2018).

Das Carcinoma cuniculatum zeigt ein tief penetrierendes tunnelartige Wachstumsmuster, ähnlich dem Epithelioma cuniculatum des Fußes (Aird, Johnson et al. 1954). Der grau-weiße Tumor zeigt ein exo-/endophytisches und papillomatös Wachstum mit kopfsteinpflaster-artiger oder stacheliger Erscheinung. Irreguläre, schmale und lange neoplastische Sinus verbinden die Tumoroberfläche mit dem Invasionsgrund. Mit zunehmend tiefer Infiltration erreicht der Tumor die Lamina propria und das Corpus spongiosum, von dort aus folgt das Wachstum entlang der Buck-Faszie, um dann in die Tunica albuginea und die Corpora cavernosa einzubrechen. Tief invasive mit Keratin gefüllte Zysten und Krypten können zu sehen sein, diese sind mit der Tumoroberfläche verbunden, eine Fistelbildung kann ebenfalls auftreten. Trotz tiefer Invasion zeigt der Tumor ein geringes Grading und hat in kleineren Studien bei

Diagnose weder ein Auftreten von LKM noch Fernmetastasen gezeigt (Barreto, Velazquez et al. 2007).

Das papillären Karzinom NOS („not otherwise specified“), ist ebenfalls HPV- und hat ein exophytisches Wachstumsmuster. Seine Prognose ist gut (Erbersdobler 2018, Hakenberg, Compérat et al. 2018).

Das pseudohyperplastische Karzinom ist ein gut differenziertes, nicht HPV-assoziiertes nicht-verruköses PeCa. Typischerweise an der Vorhaut lokalisiert und mit dem Lichen sclerosus assoziiert. In der Studie von Cubilla und Kollegen werden 10 Fällen mit gut-differenzierten SCC mit pseudohyperplastischen Anteilen vorgestellt (Cubilla, Velazquez et al. 2004). Das mittlere Alter der Patienten war 69 Jahre, der Großteil der Tumore betraf die innere Mukose des Präputiums. Die Tumore waren flach oder leicht erhaben, weiß und granuliert und maßen circa 2cm. Charakteristische histologische Merkmale sind von reaktivem fibrotischen Stroma umgebene Nester keratinisierter Squamosezellen mit minimalen Atypien. Der Lichen sclerosus war in allen Fällen gut darstellbar, dies unterstütze die These zur Karzinogenese durch chronische Inflammation. Diese Assoziation findet sich neben einigen Arten des Peniskarzinoms auch in atypischen epithelialen Veränderungen und Präkanzerosen (Cubilla, Velazquez et al. 2004).

Das pagetoide SCC in situ (PSCCIS) ist charakterisiert durch zytologisch atypische Zellen mit häufig fahlem Zytoplasma, die einzeln und in Nestern innerhalb der Epidermis in der namensstiftenden pagetoide Verteilung arrangiert sind. Das Wachstumsmuster des PSCCIS kann einen extramammären M. Paget (EMPD) vortäuschen. Es ist schwierig, die beiden seltenen Entitäten in der Histopathologie zu differenzieren. In einer Studie zeigten alle 30 Proben mit PSCCIS im Vergleich zu EMPD stark nukleäre Positivität für p63 in den neoplastischen Zellen. Die p63-Expression ist deshalb ein Marker zur Differenzierung von PSCCIS und EMPD (Chang, Prieto et al. 2014). Das routinemäßige Nutzen immunhistochemischer Panels (CK7, CK20, CEA, p63, AE1/AE3, CAM 5.2, S100, Melan-A) könnte nützlich für die Differentialdiagnostik des pagetoiden SCC sein, um so einen EMPD, das maligne Melanom, vom Urothel-ausgehende CIS und andere seltenere Erkrankungen wie pagetoide Dyskeratosis, Klarzell-Papulose und muzinöse Metaplasie auszuschließen (Amin, Griffith et al. 2014).

Sarkomatoide Karzinome sind seltene high-Grade Tumor, die sich typischerweise durch die hauptsächlich vorhandenen Spindelzellen identifizieren lassen. Diese atypischen Spindelzellen sind in verflochtenen Faszikeln angeordnet, ähnlich den Fibrosarkomen oder

Leiomyosarkomen, manchmal gemischt mit pleomorphen Riesenzellen. Weniger häufige fokale Muster sind pseudoangiomatöse, epitheloide und heterologe Differenzierung zu Knochengewebe. Mitotische Figuren und Nekrosen sind zahlreich vorhanden. Histologisch zeigen sich Ähnlichkeiten zu den sarkomatoiden Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs und dem Ösophaguskarzinom (Velazquez, Melamed et al. 2005). In einer Studie von Velazquez und Kollegen waren 15 (4%) von 400 Patienten mit penile SCC sarkomatoide Karzinome (Velazquez, Melamed et al. 2005). Die histopathologische Studie untersuchte die immunhistochemische-Expression von AE1/AE3, Cam 5.2, 34βE12, EMA (Epithelmembran-Antigen), Vimentin, MSA (Muscle specific actin), SMA (Smooth Muscle Actin), Desmin, S100, p63, p53 und per in situ Hybridisierung das Vorhandensein von HPV-DNA. Das mittlere Alter der Patienten war 59 Jahre, die mittlere Tumorgroße war 5cm und von neun darauf untersuchte Patienten wiesen acht (89%) LKM auf. Die meisten Tumore imponierten als große, polypoid wuchernde und ulzerierende Geschwulst der Glans mit tiefer Invasion der Corpora cavernosa und der Haut. Insgesamt imponieren sie als ungewöhnlich große aggressive Tumore, die mit LKM und schlechtem Outcome assoziiert sind. Differentialdiagnostisch müssen penile Sarkome und Melanome ausgeschlossen werden. Zytokeratin 34βE12 und p63 erschienen spezifischer und sensitiver als die anderen getesteten Marker. Das sarkomatoide Karzinom hat eine DOD von 75% und so die schlechteste Prognose der penilen SCC (Hakenberg, Compérat et al. 2018).

Pseudoglanduläre (adenoide, akantolytische) penile SCC enthalten zahlreiche muzinöse Zellen und imitieren durch adenoide oder pseudoglanduläre Merkmale das Aussehen echter glandulärer Tumore oder Adenokarzinome. Neben den sehr seltenen penilen Adenokarzinomen existieren auch Mischformen mit squamösen und glandulären Anteilen. Entspringt deren Ursprungszelle wahrscheinlich dem oberen Epithel, so werden sie als oberflächliche Adenokarzinome bezeichnet. Ist ihr Ursprung in den distalen urethralen oder periurethralen Zellen der Littre-Drüsen nennt man sie glanduläre Tumore. Auch Mukoepidermoidkarzinome wie im Bereich des Mundes, des Augenlids oder der Vagina können auftreten. Die wichtigste Differentialdiagnose hierbei ist die Unterscheidung zwischen echten glandulären und den pseudoglandulären Tumoren (Cunha, Guimaraes et al. 2009). In einer Studie mit 375 diagnostizierten penilen SCC zeigten sieben vorwiegend pseudoglandulären oder adenoiden Merkmalen. Das mittlere Alter der Patienten betrug 54, die Tumore waren im Durchschnitt 4,6cm groß und betrafen multiple anatomische Strukturen oder alleinig die Glans. Mikroskopisch wiesen sie akantolytische Areale auf, die zwischen soliden Nekrosenestern und leeren Pseudolumina schwanken, umgeben sind sie von einschichtigem Platten- oder

Zylinderepithel. Die Tumore wiesen tiefe vaskuläre und perineurale Invasion und ein hohes Grading auf. Drei Patienten zeigten LKM von denen zwei verstarben. Die übrigen fünf Patienten starben etwa durch andere Ursachen oder sind ohne Tumornachweis am Leben. Das pseudoglanduläre Karzinom hat eine DOD von >50% und so eine wesentlich schlechtere Prognose als das adenosquamöse Karzinom (Hakenberg, Compérat et al. 2018).

Bei den HPV-assoziierten Karzinomen ist das basaloide Ca am häufigsten, es ist schlecht differenziert und zeigt solide Nester basaloider Zellen oft mit zentralen komedoartigen Nekrosen und typischerweise positiver p16 Expression. Es handelt sich um einen aggressiven Tumor mit frühem Auftreten von LKM und schlechter Prognose (>50% DOD) (Erbersdobler 2018, Hakenberg, Compérat et al. 2018).

Das warzige (kondylomatöse) Karzinom unterscheidet sich vom gutartigen Condyloma acuminatum durch den mikroskopischen Nachweis durchgehender Kernatypien, ein invasives Wachstumsmuster und die Assoziation mit HR-HPV Typen. Die Prognose ist besser als die des basaloiden Karzinoms und es wird eine geringe Mortalität beschrieben. Der Mischtyp aus warzigem und basaloidem Karzinom hat hingegen eine schlechtere Prognose (DOD=30%) (Erbersdobler 2018, Hakenberg, Compérat et al. 2018).

Das klarzellige Karzinom ist ein SCC mit sehr hellem, glykogenreichen Zytoplasma und IHC-positiv für p16. Die DOD beträgt 20% (Erbersdobler 2018, Hakenberg, Compérat et al. 2018).

Das lymphoepitheliomähnliche Karzinom ist mit seinem dichten lymphatischen Stroma, morphologisch ähnlich zu den lymphoepithelialen Karzinomen der Nasopharynx und des Magens. Allerdings hier nicht mit EBV, sondern mit HPV assoziiert (Erbersdobler 2018).

SCC mit einer Invasionstiefe von <5mm haben gewöhnlich ein sehr geringes Risiko für regionale Metastasen, während Tumore mit einer Dicke >10mm ein hohes Potential zur Metastasierung aufweisen. Eine signifikante Anzahl an SCC gehört jedoch zur intermediären Gruppe, deren Invasionstiefe zwischen 5 und 10 mm liegt, was die Inzidenz regionaler LKM sehr schwierig vorherzusagen macht. In dieser Gruppe ist das Dilemma zwischen Übertherapie durch inguinale Lymphadenektomie (LAD) und signifikanter Prognoseverschlechterung bei nicht erkannten LKM besonders groß (Velazquez, Ayala et al. 2008). In einer retrospektiven Studie von Velazquez und Kollegen wurden 134 partiellen Penektomie-Präparate mit einer Invasionstiefe von 5-10mm, alle davon mit korrespondierenden LKM, evaluiert (Velazquez, Ayala et al. 2008). Hohes Grading und Perineuralscheideninvasion waren signifikant mit LKM assoziiert. Nodale Metastasen traten bei 2/25 bei G1- (8%), 24/46 bei G2- (52%), 40/63 bei G3-

differenzierten Tumoren (63%) auf. Mit steigendem Grading ist also eine verstärkte lymphogene Metastasierung zu beobachten. Von 48 Patienten mit perineuraler Invasion wiesen 33 Fällen Metastasen auf (69%). Die mittlere Tumordicke, die anatomische Lage der Invasion und vaskuläre Invasion waren statistisch nicht signifikant zur Differenzierung von metastasierten und nicht metastasierten Neoplasien. 50% der Tumore mit einer Invasionstiefe zwischen 5 und 10mm sind nicht mit Metastasen assoziiert, was bedeutet, dass bei ihnen eine inguinale LAD eine komplikationsreiche Übertherapie darstellt. Ein hohes Grading und perineuraler Invasion sind signifikante Risikofaktoren für regionale Metastasen. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von LKM bei Patienten mit G1 ohne perineurale Invasion ist äußerst gering, während sie bei high-grade Tumore mit einer perineuralen Invasion in 80% auftreten (Velazquez, Ayala et al. 2008).

2.5 Diagnostik

Das Peniskarzinom imponiert zwar oftmals durch derbe Veränderungen, endo- und exophytisches Wachstum und seine Lokalisation. Tumore können jedoch versteckt unter einer bestehenden Phimose wachsen oder in der Differentialdiagnose mit ulzerösen venerologischen Erkrankungen oder HPV-assoziierten benignen Läsionen wie den Condylomata acuminata oder dem Buschke-Löwenstein-Tumor verwechselt werden (Sievert, Drager et al. 2018). Die Lokalisation des PeCa ist in 34,5%-48% der Fälle die Glans, in 13,2%-21% das Präputium, in 9% Glans und Präputium und in <2% der Schaft (Pow-Sang, Ferreira et al. 2010, Sohn, Dietrich et al. 2018). Es erscheint oft als grauweiße Neoplasie, die exophytisch wächst und eine starke Verhornung aufweisen kann. Vertikale Tumore wachsen primär in die Tiefe, zeigen so ein frühes invasives Wachstum und können ulzerieren. Superfizielle Tumore wachsen, ähnlich dem superfiziell spreitenden malignen Melanom, horizontal entlang der Oberfläche. Vorrausgehende Präkanzerosen und Vorläuferläsionen (PIN) können weiterhin um den Tumor bestehen und zu multizentrischen, voneinander unabhängigen Tumoren führen (Pow-Sang, Ferreira et al. 2010, Erbersdobler 2018, Sievert, Drager et al. 2018). Die Diagnosestellung erfolgt auf Grund von Angst, Schamgefühlen und Vermeidungsverhalten häufig verspätet in einem fortgeschrittenen Stadium. 15-50% der PeCas werden innerhalb eines Jahres nach Beginn der ersten Symptome diagnostiziert (Drager, Milerski et al. 2018). Aber auch von ärztlicher Seite kann es zu Verzögerungen durch wochenlange topische Therapie neuauftretener peniler Läsionen oder antibiotischer Therapie bei inguinaler Lymphknotenschwellung kommen. Bei unklaren penilen Läsionen sollte frühzeitig eine histologische Sicherung zur Diagnosestellung erfolgen (AWMF 2020).

Spätsymptome sind urethrale Fistelbildung, Obstruktion der ableitenden Harnwege, Tumorkachexie und Abgeschlagenheit (Touloupidis, Zisimopoulos et al. 2007, Pow-Sang, Ferreira et al. 2010, Gump and Henß 2014). Patienten ohne Behandlung sterben gewöhnlich innerhalb von 2 Jahren nach Diagnosestellung durch Komplikationen des unkontrollierten lokoregionären Wachstums und einer Fernmetastasierung (Erbersdobler 2018).

In der klinischen Untersuchung sollten die visuellen und palpatorischen Befunde ausführlich dokumentiert werden, mit der dazu gehören Lokalisation, Tumorgröße, Wachstumsart, sowie Verschieblichkeit oder Fixierung des Gewebes. Eine gleichzeitige digital-rektale Untersuchung und eine penil-perineale Palpation können zur Einschätzung der Ausdehnung in die Cura der Schwellkörper dienen. In der Anamnese sollten die Sexualfunktion und Miktions dokumentiert werden. So können sich schon erste Anhaltspunkte zur Ausdehnung und Infiltration ergeben (Sievert, Drager et al. 2018, AWMF 2020). Zur apparativen Diagnostik ist die Sonographie Mittel der Wahl, da man hiermit ein nicht-invasives, effizientes und breit verfügbares Instrument zur Beurteilung der Tiefeninfiltration der Schwellkörper zur Hand hat. Schnittbildverfahren wie die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) oder das Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie-CT (FDG-PET/CT) erweisen sich in Sensitivität und Spezifität zur Beurteilung der lokalen Ausdehnung im Vergleich zur klinischen Diagnostik und der Sonographie als unterlegen. Die MRT-Untersuchung in einer artifiziell induzierten Erektion ist äußerst unangenehm für den Patienten und sollte deshalb vermieden werden. Auch ist der informative Mehrgewinn gering, da das intraoperative Staging, mit Schnellschnittuntersuchung zur Sicherstellung negativer Schnittländer letzten Endes entscheidend ist. Das PET-CT wird in der Diagnostik lokaler Ausdehnung vor allem durch seine begrenzte räumliche Auflösung limitiert (Hakenberg, Compérat et al. 2018, Sievert, Drager et al. 2018, AWMF 2020).

Bei der Behandlung des CIS und der PIN mit flächiger Ausbreitung kann die Ausdehnung mittels Essigsäure-Testung (3-5%) oder photodynamischer Diagnostik mit 5-Aminolaevulinsäure (PDD + 5-ALA) besser sichtbar gemacht werden. Durch die Applikation von Essigsäure kommt es zur weißen Verfärbung des veränderten Gewebes, da dieses im Vergleich zu gesunden Zellen mehr Proteine enthält, die durch die Säure denaturieren. Diesen Effekt kann man sich beispielsweise vor einer Laserablation zu Nutze machen, um den Eingriffsbereich zu markieren. Bei der PDD wird 5-ALA mit Lidocain gemischt und als Gel auf den Penis aufgetragen, intraoperativ können so Läsionen durch die Beleuchtung mit blauem Xenon-Licht sichtbar gemacht werden (AWMF 2020).

Der Beurteilung der regionären inguinalen Lymphknoten kommt eine besondere Rolle in der Diagnostik zu, da das Vorhandensein von LKM den prognostisch wichtigsten Faktor darstellt (3 Jahres Überleben cN0 91,7% /cN3 38,3%) (Sievert, Drager et al. 2018). Die lymphogene Metastasierung erfolgt unabhängig von der Lokalisation des Primärtumors, ohne Seitenpräferenz, in die inguinalen Lymphknoten, von dort streng ipsilateral nach pelvin, danach retroperitoneal in die Lymphknotenpakete um die großen Gefäß (AWMF 2020). In der ersten klinischen Untersuchung sollten neben dem Penis, auch die inguinalen Lymphknoten gründlich palpatorisch untersucht werden. Dabei sind Anzahl, Größe und Verschieblichkeit seitengetreunt zu dokumentieren. Für das weitere Vorgehen unterscheidet man zwischen palpatorisch auffällig vergrößerten und klinisch unauffälligen Lymphknoten. Letztere weisen in ca. 25% der Fälle Mikrometastasen auf, die trotz aller aktuellen diagnostischer Bestrebungen ohne invasive Sicherung nicht detektierbar sind. Schnittbildverfahren weisen für Mikrometastasen eine unbefriedigende Sensitivität auf (cN0 57%) (Kommu, Hadway et al. 2004, AWMF 2020). Mit der inguinalen Ultraschalluntersuchung können vergrößerte Lymphknoten mit auffälligem Longitudinal/Transversal-Diameter, veränderter Binnenstruktur, fehlender Hilusechogenität und extranodaler Ausdehnung bei nicht palpatorisch vergrößerten Lymphknoten identifiziert werden (Hakenberg, Compérat et al. 2018). Risikofaktoren für LKM sind ein hohes T-Stadium und Grading, sowie lymphovaskuläre und perineurale Invasion. Aktuell gibt es keine empfohlenen Nomogramme zur Risikostratifizierung, aber in mehreren Studien wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen (Velazquez, Ayala et al. 2008, Buonerba, Di Lorenzo et al. 2016, Bandini, Spiess et al. 2020). In der Vergangenheit wurden geschwollene Lymphknoten oftmals probatorisch 4 Wochen antibiotisch therapiert, da diese beim Auftreten eines PeCa jedoch höchst verdächtig auf Metastasen sind sollte jede Verzögerung vermieden werden (Sievert, Drager et al. 2018).

Bei nicht palpablen Lymphknoten bis Stadium pT1a (pT1G1/G2) sollte auf eine bioptische Sicherung der Lymphknoten verzichtet und stattdessen eine klinische Surveillance zur Vermeidung von Übertherapie angestrebt werden (AWMF 2020). Bei nicht palpablen Lymphknoten sollte ab Stadium pT1b (pT1G3) eine invasive Untersuchung mit modifizierter inguinaler Lymphadenektomie (MIL) oder dynamischer Sentinel-Lk-Biopsie (DSNB) angestrebt werden. Bei der MIL werden die superfiziellen und tiefen medialen Lymphknoten entfernt, auf Grund des kleineren Operationsbereichs und der Schonung von Gefäßen und anderer Leitungsbahnen ist diese Technik deutlich komplikationsärmer als die radikale inguinale LAD (RIL). Die DSNB kann allein oder in Kombination mit einer Sonographie-gesteuerten Feinnadelbiopsie (FNB) durchgeführt werden. Zur Markierung des

Sentinel-Lymphknoten können Pigment basierte Tracer wie Berliner Blau oder Indocyaningrün, radioaktive Marker wie Technetium oder supramagnetische Stoffe wie Eisenoxid-Nanopartikel (SPION) genutzt werden. Im Vergleich zwischen MIL und DNSB weist Letztere eine höhere falsch-negativ Rate auf, was mehr nicht detektierte Metastasen bedeutet (AWMF 2020). Bei schlechten Untersuchungsbedingungen wie bei stark adipösen Patienten können Schnittbildverfahren oder Sonographie zur besseren Beurteilbarkeit der lokoregionären Lymphbahnen eingesetzt werden.

Tastbare inguinale Lymphknoten sollten durch operative Entfernung histologisch gesichert werden. Zunächst wird nur ein Lymphknoten entnommen und im Schnellschnitt histopathologisch untersucht, bei Metastasen-Nachweis sollte eine ipsilaterale RIL erfolgen. Bei kurativem Ansatz sollte eine MIL oder eine DNSB der unauffälligen Gegenseite durchgeführt werden, um eine Mikrometastasierung auszuschließen. Ein CT des Beckens kann zur Beurteilung pelviner Lymphknoten angefertigt werden. Untersuchungen mit dem PET/CT zeigen hohe Sensitivität (88-100%) und Spezifität (98-100%), wenn es darum geht metastatische Herde und Lymphknoten bei bestehenden Auffälligkeiten abzuklären (Hakenberg, Compérat et al. 2018, Sievert, Drager et al. 2018). Sollten mindestens 2 befallene Lymphknoten auf einer Seite, bilaterale inguinale Metastasen, eine extranodale Extension über die Lymphknotenkapsel hinaus oder fixierte Lymphknotenpakete vorliegen, ist eine pelvine LAD indiziert (AWMF 2020). Bestehen fixierte und/oder exulzerierte inguinale Lymphknotenpakete muss von einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium ausgegangen werden. Eine erweiterte Diagnostik der pelvinen und retroperitoneale Lymphknoten, sowie eine Suche nach Fernmetastasen ist indiziert. Bei stark vergrößerten Lymphknoten („bulky disease“) ist eine neoadjuvante Chemotherapie indiziert, hiermit kann ein Downstaging erzielt werden, was eine kurative R0-Operation ermöglichen kann (AWMF 2020).

Eine systemische Metastasierung tritt erst in späten, fortgeschrittenen Stadien auf, da auf lymphogenem Weg erst einmal oben beschriebene Stationen durchwandert werden müssen und eine hämatogene Metastasierung selten erfolgt. Als Fernmetastasen werden neben den Organmetastasen (meist Lunge, Leber, Knochen, Gehirn) auch retroperitoneale und mediastinale Lymphknotenmetastasen gewertet. Ein CT des Thorax, Abdomens und Beckens sind hierbei im Rahmen des Stagings indiziert. Gegebenenfalls kann auch ein PET-CT weitere Informationen liefern, hierbei ist aber eine schwankende Sensitivität je nach Organ (56-100%) zu beachten (Hakenberg, Compérat et al. 2018, AWMF 2020).

2.6 Molekularpathologie

In der aktuellen S3-Leitlinie des Peniskarzinoms (AWMF 2020) existieren zurzeit keine molekularbiologischen Marker, die für die Routinediagnostik des Peniskarzinoms empfohlen werden können. Auf Grund der Seltenheit des Peniskarzinoms stützen sich viele molekularbiologischen und genetischen Untersuchungen auf retrospektive Betrachtungen kleiner Patientenkollektive. Im Fokus stehen bisher häufig, im Zusammenspiel mit der Pathogenese, die p16- und p53-Überexpression. Zum einen, weil hier eine direkte Interaktion mit den viralen Onkogenen E6 und E7 nachgewiesen wurde, zum anderen, weil sich hiernach das PeCa in HPV-assoziierte (p16-Überexpression) und HPV-negative Tumore (keine p16-Überexpression, häufig p53-Überexpression) einteilen lässt. Allgemeine genetische Untersuchungen auf Chromosomenaberrationen (Aneuploidie), MYC-Amplifikationen, die die Expression anderer Gene verstärken, epigenetische Alterationen wie Hypermethylierung von Promotorbereichen und Allel-Imbalancen werden wie bei anderen Tumorentitäten im Rahmen von Studien durchgeführt. Auch Ki-67 kann hierbei als Proliferationsmarker herangezogen werden, um eine Aussage über Lymphknotenmetastasierung und Gesamtüberleben zu treffen (McDaniel, Hovelson et al. 2015, AWMF 2020).

Aktuell befassen sich viele Studien mit molekularen Signalwegen die bereits bei anderen Tumoren erfolgreiche und vielversprechende therapeutische Angriffspunkte darstellen, so unter anderem PD-1/PDL-1, EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor), VEGF (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) und speziell für HPV-positive Tumore, therapeutische Impfstoffe und Medikamente gegen HPV.

2.6.1 p16^{INK4A}-Expression

Bei 30-50% der Patienten kann HPV-DNA oder p16 (synonym p16^{INK4a})-Surrogatmarker nachgewiesen werden, diese positiven Tumoren haben ein signifikant besseres DSS, als jene die negativ getestet wurden (Sand, Rasmussen et al. 2018). In HPV-assoziierten Subtypen wie dem basaloiden und dem warzig-basaloiden SCC ist die Prävalenz mit 84% und 75,7% nochmals wesentlich höher, insgesamt ist HPV16 der am häufigsten vorliegende Genotyp. Während Metaanalysen systematischer Reviews das PeCa mit einer HPV-Prävalenz von bis zu 50% im Mittel beschrieben, liegt sie bei den PIN bei 80% (Olesen, Sand et al. 2019). Die HPV Onkoproteine E6 und E7 sind in der Lage die Tumorsuppressorproteine p53 und Retinoblastom(pRB)-E2F zu inaktivieren. Daraus folgt eine Überexpression des zellulären Tumorsuppressors p16 und eine Dysregulation des Zellzyklus (Proliferation, Differenzierung, Apoptose) der infizierten Zellen. Der Endpunkt dieser Veränderungen ist die Inhibierung der

Zyklus-abhängigen Proteinkinase CDK4/CDK6 mit fehlendem Zellzyklusstopp in der G1-Phase (Zhang, Zhang et al. 2018). Neben der physiologischen Expression von p16 kommt es aber auch in 15% der HPV⁻ Tumore zu einer Hypermethylierung und damit zu einer Inaktivierung der p16-Promotorregion. Der Nachweis von p16 erfolgt in der Histopathologie mittels IHC-Nachweises der Akkumulation des Proteins im Zellkern (May, Brookman-May et al. 2018)

Untersuchungen zum Auftreten des PeCa im Norden und Nordosten Brasiliens, den Gebieten mit der höchsten Inzidenz, zeigten hierbei besondere Ergebnisse. Untersucht wurde die Korrelation von p16-Überexpression und HPV-Infektionsstatus mit EBV-Infektionen. Das onkogene Potential von EBV ist für verschiedene Tumorentitäten gut beschrieben, seine Rolle in der epithelialen penilen Onkogenese muss aber noch gezeigt werden. HPV positive PeCa wiesen generell im Vergleich zu den negativen ein geringeres Grading auf. EBV-Infektionen wurden in einem Drittel der Patienten beobachtet, Koinfektion mit HPV bei einem Viertel der Patienten. Da die unterschiedliche Ätiologie und Pathophysiologie in der Karzinogenese des PeCa aktuell noch in vielen Punkten ungeklärt ist, bleibt die genaue Rolle der onkogenen Viren wie HPV und EBV im Beginn der Tumorgenese immer noch offen (Martins, Cunha et al. 2020).

2.6.2 Tumorsuppressorgen TP53/TP63

TP53 ist ein Tumorsuppressorgen im kurzen Arm des Chromosoms 17, sein Genprodukt ist unter anderem der nukleäre Transkriptionsfaktor p53 und das Homolog p63. In etwa 70% der soliden Tumore findet sich eine Mutation des Tumorsuppressors, bei Peniskarzinomen findet sich diese genetische Alteration vor allem bei den HPV⁻ Tumoren. HPV⁺ Tumore weisen dagegen eine Degradierung von p53 auf. Hier wird das Tumorsuppressorprotein durch die Bindung des Onkoprotein E6 an E6AP und dem daraus entstehenden Komplex durch Polyubiquitierung inaktiviert. In Peniskarzinomen finden sich solche HPV-assoziierten Degradationen wie auch genetische Alterationen in 25-91% der Fälle (May, Brookman-May et al. 2018, Wang, Baddock et al. 2024). Veränderungen der Wirtszell-DNA durch HPV mit Alterationen der p53-Expression machen Zellen anfälliger für die kanzerogenen Effekte von Mutagenen und Noxen wie beispielsweise Tabakrauch (Rubin, Kleter et al. 2001). In anderen Karzinomen wie dem Nierenzell-Ca sind Korrelationen mit negativer Prognose assoziiert, für das PeCa gibt es hierbei in Studien widersprüchliche Ergebnisse. Histopathologisch kann die Akkumulation des Proteins mittels IHC nachgewiesen werden (May, Brookman-May et al. 2018).

Histologischer Tumortyp, TNM-Stadium, Differenzierungsgrad und die Perineuralscheideninvasion sind die wichtigsten konventionellen Prognoseparameter. Eine verstärkte p16-Expression als Surrogatmarker für eine HPV-Infektion ist mit einer besseren Prognose assoziiert, während mutationstypische p53-Expression als ungünstig zu betrachten ist. Hieraus erklärt sich möglicherweise auch, dass HPV-assoziierte PeCas verallgemeinert mit einer besseren Prognose beschrieben werden als die HPV⁻, die oftmals p53 Alterationen aufweisen. Hierbei gilt allerdings zu beachten, dass der Subtyp ein wichtiger Prognoseparameter ist und sowohl HPV-assoziierte PeCas aggressivere Formen haben und HPV negative wiederum besser Krankheitsverläufe aufweisen können. P16 und p53 stehen hierbei stellvertretend für die beiden unterschiedliche Pathogenesewege und finden auch Erwähnung in der neuen TNM. Es bedarf weiterer Forschung zur Identifizierung von prognostischen Markern für die histopathologische Routinediagnostik, Therapieplanung und möglicherweise als Ansatz neuer Therapien (Erbersdobler 2018).

Das p63, ein Homolog von p53, produziert 6 verschiedene Isoformen, die wichtig zur Entwicklung epithelialer Gewebe und der ebenfalls in Teilen HPV-assoziierten Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome (HNSCC) sind. In vielen dieser Tumoren ist die Expression der p63-Isoformen hochkomplex mit einer Überexpression von Δ Np63- und p63 β -Isoformen. Aktuell ist wenig über die genaue Funktion der verschiedenen Δ Np63-Isoformen bekannt. Bisher wurde die Überexpression von drei unterschiedlichen Isoformen identifiziert, hierbei ist Δ Np63 β effektiver in der Geninduktion als Δ Np63 α und Δ Np63 γ , während Δ Np63 γ zur effektivsten Genrepression im Stande ist. Tumoren, die selbst geringe Mengen an Δ Np63 β oder Δ Np63 γ exprimieren können bestimmte klinisch-pathologische Merkmale aufweisen, die für die Metastasierung und therapeutisches Ansprechen relevant sind. Die Induktion von Cyclooxygenase-2 (COX-2) wurde bei jeder Isoform durch PCR und Western Blot nachgewiesen. COX-2 Induktion kann das radiotherapeutische Ansprechen von HNSCC inhibieren. Δ Np63 fördern Zellüberleben und kann das therapeutische Ansprechen von HNSCC beeinflussen (Boldrup, Coates et al. 2009).

In einer immortalisierten Ki-PeCa-Zelllinie aus dem Primärgewebe (P2) sowie Lymphknotenmetastasen (L2, L3) konnte nachgewiesen werden, dass HPV16-Onkoproteine die p63-Expression durch Modulation kritischer Regulatoren steuern, während die Integration von p63 in den offenen Leserahmen (OLR) die Onkogenexpression erleichtert. Die resultierende Feed-Forward-Stimulation führt zu erhöhten p63-Leveln, die wiederum die Freisetzung des Neutrophilen Rekrutierungs-Chemokins CXCL8 verbessern. Hierbei führen

erhöhte CXCL8-Level zu einer erhöhten Oberflächenexposition des Fc-Rezeptors (Fc α RI) von humanen IgA-Antikörpern auf Neutrophilen und korrelieren mit einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Antikörper-abhängiger Neutrophilen-vermittelter Zytotoxizität (ADCC) unter Verwendung eines EGFR-spezifischen IgA2-Antikörpers. Die IHC-Färbung von Tumormikroarrays konnte zeigen, dass eine erhöhte Expression von p63 zusammen mit der Infiltration von Neutrophilen bei HPV-positiven Peniskarzinomen mit einem höheren Tumorgrad signifikant häufiger auftritt. Dies könnte ein vielversprechender Hinweis auf ein diagnostisches sowie therapeutisches Markerprofil für Patienten mit negativen Prognosefaktoren sein. Der gezielte Einsatz von Immuntherapeutika zur Stimulation von gegen den Tumor gerichteten Neutrophilen wäre somit ein möglicher Ansatzpunkt für diese Subgruppe an Patienten (Bernhard, Zwick et al. 2020).

2.6.3 Ki-67-Proliferationsindex

Das nukleäre Nicht-Histonmatrixprotein wird im Zellkern in allen Phasen des Zellzyklus (außer G0) exprimiert. In der molekularpathologischen Diagnostik kann es durch IHC mit einem Ki-67-Ak detektiert werden, um prozentual die Menge sich teilender maligner Zellen anzugeben. Ein hoher Index spricht damit für hohe proliferative Aktivität und einen malignen Charakter des Tumors, weswegen dieser Marker auch mit der Prognose korreliert. Beim Peniskarzinom ist die Studienlage widersprüchlicher als bei anderen Tumorentitäten, in manchen Untersuchungen zeigten sich signifikante Assoziationen zu fortgeschrittenem T-Stadium, dem Auftreten von LKM, Tumorprogression und histologischem Subtyp (basaloider Subtyp). Andere Studien konnten solch signifikante Unterschiede nicht nachweisen oder nur in univarianter Korrelation (May, Brookman-May et al. 2018).

2.6.4 TMB

Die Tumormutationslast (TMB) fasst die Gesamtzahl somatischer und codierender Mutationen, Basensubstitutionen, Insertionen oder Deletionen pro Megabase des zu untersuchenden Genoms zusammen. Diese Veränderungen der codierenden Regionen von spezifischen Genen werden mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) gemessen, summiert und anschließend gefiltert, um Störsignale zu reduzieren. (Chalmers, Connelly et al. 2017). Eine hohe Mutationslast als solche soll durch die Ausbildung von Neoantigenen und Tumor-spezifischen Antigenen (TSA) eine verstärkte immunogene Wirkung hervorrufen und hierdurch beispielsweise zu einem verbesserten Ansprechraten von CTLA-4- und PD-L1-Therapeutikern führen (Chalmers, Connelly et al. 2017, Goodman, Kato et al. 2017). Physiologisch können diese Tumor-Neoantigene mittels Peptidbindung an MHC-I über die Zellmembran CD8⁺

zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden. Weitergeführt könnte dieser Ansatz der Neoantigene helfen neue individualisierte Behandlungsansätze für solide Tumore wie Neoantigen-spezifische T-Zell-Therapien oder Neoantigen-Vakzine zu entwickeln (Gubin, Artyomov et al. 2015).

2.6.5 PD-1/PD-L1-Expression

PD-L1 (B7-H1) ist ein Ligand, der nach Bindung an das zellmembranständige Glykoprotein PD-1 aus der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) als Immuncheckpoint-Inhibitor fungiert. Abseits von B- und T-Lymphozyten sowie Tumorgewebe wird PD-L1 nicht von physiologischem menschlichem Gewebe exprimiert. Die Bindung inhibiert Proliferation und Zytokin-Produktion durch aktivierte T-Zellen. Hierdurch ergibt sich eine zentrale Rolle der T-Zellen in der Vermittlung einer gegen Tumore gerichteten Immunantwort. Umgekehrt führt die durch proinflammatorische Zytokine induzierte Hochregulierung von PD-L1 im Tumormikromilieu zu einer Immunevasion für den Tumor (Dong, Strome et al. 2002). PD-L1 wird vielseitig und variabel in einer Reihe von Tumoren exprimiert, so dass die Blockade des PD-L1-PD-1-Signalwegs Vorteile im Gesamtüberleben beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, Melanomen, Nierenzellkarzinom und Urothel-Ca zeigt. Studiendaten zeigen eine verbesserte Wirkung der Checkpoint-Inhibitoren bei Tumoren mit hohen Mutationsraten (Al-Ahmadie 2016). Genexpressionsanalysen von PD-L1 bei PeCa zeigte keine signifikante Korrelation mit spezifischen genetischen Veränderungen, aber eine Assoziation mit steigender Tumormutationslast. Die Expression von PD-L1 im Tumor und dessen Mikromilieu, sowie die TMB könnten Prädiktionsfaktor für das Ansprechen auf eine Anti-PD-L1 Checkpoint-Inhibitor-Therapie sein (Al-Ahmadie 2016).

In einer retrospektiven Untersuchung von Ottenhof und Kollegen konnte eine PD-L1-Expression in 48% der primären Peniskarzinome nachgewiesen werden, diese war mit einem negativem HR-HPV-Status assoziiert (Ottenhof, Djajadiningrat et al. 2017). Von 200 erfolgreich gefärbten Proben ($\geq 1\%$ cut-off Level) zeigten 96 Proben (48%) eine ausschließlich zytoplasmatische Färbung, davon waren 79 (82%) Hr-HPV⁻. PD-L1 war in 59 (62%) der Proben vor allem an der Grenzfläche von Tumor und Stroma (randständige Expression) positiv, 36 Proben zeigten eine diffuse PD-L1 Expression innerhalb des Tumors. Letzteres war mit positivem Nodalstatus beim Staging und schlechtem DSS assoziiert (HR 2,58), während randständige Expressionsmuster mit tumorfreien Lymphknoten (OR 0,4) assoziiert waren. Bei HR-HPV⁻ Tumoren waren diese Assoziationen noch ausgeprägter vorzufinden (OR 0,25; HR 3,92). Die Resultate dieser Untersuchung zu PD-1/PD-L1 Checkpoint-Inhibitoren zeigen, dass

die Untersuchung der verschiedenen Expressionsmuster und ihren zugrundeliegenden biologischen Mechanismen eine wichtige Rolle spielen könnte (Ottenhof, Djajadiningrat et al. 2017).

Das Immunsystem des Patienten spielt eine zentrale Rolle in vielen Tumoren, einschließlich den SCC. In einer weiteren retrospektiven Betrachtung von Ottenhof und Kollegen der bereits untersuchten 213 penilen SCC wurde der HPV-, HLA I- und PD-L1-Status, sowie das Vorhandensein von Tumor-infiltrierende Makrophagen und zytotoxische T-Zellen untersucht (Ottenhof, Djajadiningrat et al. 2018). Eine diffuse PDL1 Expression, CD163⁺ Makrophagen Infiltration, untypische HLA I Hochregulation und eine geringe stromale CD8⁺ T-Zell-Infiltration waren mit dem Auftreten von LKM assoziiert. Die Tumor-PD-L1-Expression war sowohl in der univariaten als auch als einziges in der multesignifikanten Analyse signifikant mit LKM assoziiert (OR 2,8, p = 0,05). Im Vergleich von Tumoren mit nur marginaler PD-L1-Expression [OR 4,16, p < 0,01] und mit kombiniert negativer/marginaler PD-L1-Expression (OR 3,28, p < 0,01) war das Auftreten von LKM bei diffusem PD-L1 Expressionsmuster am höchsten. PD-L1 war der Einzige untersuchte Faktor der im Vergleich von HPV^{+/−} Proben Unterschiede in der Expression zeigte. Hr-HPV Tumorproben und solche mit diffuser PD-L1-Tumorzellexpression waren auch nach Korrektur der klinischen Parameter signifikant mit erniedrigtem DSS assoziiert [HR 9,7, p < 0,01; HR 2,8, p = 0,03]. Die Komplexität des Tumormikromilieus in Peniskarzinomen bietet viele potenzielle Ziele für eine Immuntherapie, stellt die Forschung gleichzeitig dadurch aber auch vor viele Herausforderungen (Ottenhof, Djajadiningrat et al. 2018).

In einer Studie mit 37 PeCa-Primärtumoren, wiesen 23 (62,2%) eine positive PD-L1 Expression (cut-off-Wert $\geq 5\%$) auf (Udager, Liu et al. 2016). Es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen der PD-L1 Expression in Primärtumoren und den dazugehörigen LKM. Weiter zeigte sich eine signifikante Assoziation zum histologischen Subtyp (gewöhnliches SCC) und dem Auftreten von LKM, sowie reduziertem DSS. Bei SCC ist die PD-L-Expression assoziiert mit einem schlechten klinischen Verlauf. Ein auf einer Untergruppe von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen exprimierter PD-1 Co-inhibierender Rezeptor interagiert mit PD-L1 auf Tumorzellmembranen. Dies führt zur Suppression von T-Zell-Aktivität und Proliferation, Dämpfung der anti-tumorösen Immunantwort und Inhibierung der PD-1/PD-L1 Interaktion. Eine medikamentöse Umkehr dieser Vorgänge sollte deshalb das Abtöten von Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen verstärken und könnte so beispielsweise für Patienten in prognostisch schlechten fortgeschrittenen Tumorstadien angewandt werden. Die membranöse

PD-L1 Expression ist in einer weit gestreuten Anzahl an Tumorentitäten (Mamma-Ca, Malignes Melanom, SCC der Lunge/NSCLC, Kopf-Hals-Tumore und dem Cervix-Ca) beschrieben und auch bei anderen urologischen Malignomen eine teils bereits etablierte Option zur Therapie (Blasen-Ca, Nierenzell-Ca). Die vorliegenden Subtypen zeigten, dass das gewöhnlichem SCC am häufigsten vertreten war (OR=4,8 im Vergleich zu anderen Subtypen). Insgesamt waren nur 15,4% der Proben HPV⁺, davon waren die warzig und basaloiden PeCa alle PD-L1 negativ. Das Grading der Tumore zeigte, dass keine signifikante Assoziation zwischen höherem Grading und der PD-L1 Expression besteht. Ebenso war die Assoziation zwischen höherem pathologischen T-Stadium und der PD-L1-Expression (T2-4 vs T1, 70,8% vs 40%) nicht statistisch signifikant. Es konnte jedoch eine Assoziation zwischen der positiven Expression von PD-L1 und dem Auftreten von LKM gezeigt werden (OR 10,91). Das NGS für somatische Mutationen konnte keine signifikante Assoziation zwischen der Expression des Primärtumors und genetischen Alterationen (OR 1,36) nachweisen. Auch konnte keine Signifikanz bezüglich der PD-L1-Expression und Lokalrezidiven, dafür aber für das Auftreten von Metastasen (25% vs 0% zwischen positiven und negativen Proben), dem Tod durch die Erkrankung (31,8% vs 0%) und reduziertem DSS gezeigt werden. Eine Assoziation zu verschiedenen klinisch-pathologischen High-Risk Faktoren (gewöhnliches SCC als Subtyp, LKM, Progression von Metastasen, verringertes Tumor-spezifisches Überleben) konnte gezeigt werden, während eine Korrelation zwischen HPV und PD-L1-Expression unklar bleibt. Eine hohe PD-L1-Expression ist nicht mit spezifischen genetischen Veränderungen, sondern zunehmender Tumormutationslast assoziiert. Die Effizienz von Anti-PD-1 Therapeutika wie Nivolumab für Tumore im fortgeschrittenen Stadium auch unabhängig von der PD-L1 Expression bleibt offen (Udager, Liu et al. 2016).

Die PD-1/PD-L1-Achse stellt einen entscheidenden Faktor in der Hemmung der Immunantwort und somit auch in den Escape-Mechanismen immunkompetenter Tumoren dar. Allerdings ist der molekulare Link zwischen seltenen genomischen Alterationen und dem unterschiedlichen Ansprechen auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren unzureichend verstanden (May, Brookman-May et al. 2018). Verlässliche etablierte Biomarker, die zur Risikostratifizierung und Therapieplanung stehen nicht zur Verfügung, PD-L1 und TMB sind hierfür beim Peniskarzinom noch nicht in den klinischen Alltag integriert (Bandini, Spiess et al. 2020).

2.6.6 EGFR

Der EGFR gehört zur ErB-Familie (EGFR, HER2, HER3, HER4) und spielt in der Tumorbiologie der SCC und so auch in der des PeCa eine wichtige Rolle. Als Mitglieder der

Familie der Transmembranrezeptor-Tyrosinkinase werden diese durch Homo- und Heterodimerisierung nach extrazellulärer Ligandenbindung (EGF-like Peptide) aktiviert, was die Phosphorylierung von Tyrosinresten und Signalgebung durch eine Reihe von nachgeschalteten Signalwegen verursacht (einschließlich PI3K/Akt und Ras-Raf-MEK-ERK). Homo- und Heterodimere zeigen unterschiedliche Affinität zu Liganden und unterschiedliche Signaleigenschaften (Di Lorenzo, Buonerba et al. 2014). Es gibt Hinweise darauf, dass Amplifikationen des EGFR-Gens und Mutationen der EGFR-Tyrosinkinasedomäne an der Pathogenese und Progression verschiedener Karzinomtypen beteiligt sind und diese Proteine die Zelltransformation induzieren können. Insbesondere Angiogenese, Differenzierung, Wachstum und Zellüberleben von Karzinomzellen scheinen durch ein Netzwerk von Rezeptoren/Liganden der ErbB-Familie aufrechterhalten zu werden. Je nach Studie werden diese in 25-50% der Tumore, unabhängig vom HPV-Status, in phosphorylierter Form gefunden (Normanno, De Luca et al. 2006, Di Lorenzo, Buonerba et al. 2014). HPV-positive Tumore exprimieren öfter HER33 und zytoplasmatisches Akt1, HPV-negative exprimieren häufiger phosphoryliertes EGFR (Buonerba, Pagliuca et al. 2017). Tendenziell finden sich diese EGFR-Veränderungen bei Tumoren in frühen Stadien gehäuft, was auch die unterschiedliche Inzidenz von phosphoryliertem zytologischem EGFR in Serien von Patienten mit und ohne LKM erklären könnte. Ein negativer Einfluss auf die Prognose ähnlich zum Bronchial-Ca und Kopf-Hals-Tumoren ist auch hier anzunehmen (Di Lorenzo, Buonerba et al. 2014).

Solche genetischen Veränderungen stellen aktuell bereits Angriffspunkte für andere Indikationen zugelassene Anti-EGFR-Therapeutika dar. ErbB-Proteine und ihre Liganden bilden jedoch ein komplexes System, in dem die zwischen Rezeptoren und Liganden auftretenden Wechselwirkungen den Typ und die Dauer der abgeleiteten intrazellulären Signale von der Rezeptoraktivierung beeinflussen. Dies deutet darauf hin, dass auch mehrere ErbB-Rezeptoren und verwandte Liganden notwendig sind, um eine Zelltransformation zu induzieren. Dieses Phänomen ist für therapeutische Ansätze wichtig, da das Ansprechen auf Anti-EGFR-Therapeutika sowohl von der Wechselwirkung und dem Gesamtniveau der Expression von ErbB-Rezeptoren und -Liganden der Tumorzellen abhängen könnte. Dies könnte eine Erklärung für die Erkenntnisse verschiedener Studien zu Anti-EGFR-Therapeutika sein, dass das Ansprechen nicht vom Expressionslevel der Rezeptoren im Tumor abhängt. Schon geringe Level von EGFR können ausreichen, um andere ErbB-Rezeptoren zu aktivieren. Eine Ko-Expression verschiedener ErbB-Rezeptoren und EGF-like growth factors tritt in der Mehrheit der Tumore auf. Experimentelle Therapien in in vitro-Versuchen zeigen synergistische gegen Tumor gerichtete Effekte bei der Kombination von Antisense-

Oligonukleotiden gegen EGF-like growth factors mit direkten Inhibitoren (Normanno, De Luca et al. 2006, Di Lorenzo, Buonerba et al. 2014). Ähnliches ist in der Therapie des Mamma-Ca zu beobachten, bei der Kombination des EGFR-TKI Gefinitib und dem anti-ErbB-2 Antikörper Trastuzumab. So könnte eine kombinierte Therapie zu einem besseren Ansprechen und einer längerfristigen Tumorprogressions-Kontrolle führen. EGFR könnte auch außerhalb von Tumoren wichtige Funktionen im Tumormikromilieu erfüllen. So reguliert EGFR die Fähigkeit von Stromazellen des Knochenmarks zur Osteoklasten-Differenzierung. Dies könnte bedeuten, dass die Aktivierung von EGFR im Knochenmark in die Entstehung und Progression von Knochenmetastasen involviert ist (Normanno, De Luca et al. 2006). McDaniel und Kollegen zeigten in ihrer retrospektiven Betrachtung zur EGFR- und CDK4-Amplifikationen, dass diese ein mögliches therapeutisches Ziel darstellen könnten. Eine Zusammenschau von Primärtumoren und den dazugehörigen LKM wiesen ein homogenes Bild relevanter somatischer Mutationen auf (McDaniel, Hovelson et al. 2015).

Als prädiktiver Marker war zytosolisches und phosphoryliertes EGFR in einer anderen Studie mit einer höheren Rezidivrate und Gesamtmortalität assoziiert (Di Lorenzo, Perdonà et al. 2013). In einer Studie an 28 Patienten, die mit Cetuximab, Panitumumab oder Nimotuzumab behandelt wurden konnte bei 50% der Patienten ein progressionsfreies Überleben von etwa 3 Monaten erzielt werden. Mit einer Ansprechrate von 27% bei einer medianer Überlebenszeit von 20 Wochen, zeigte sich ein Vorteil bei der Gabe von Cetuximab (Di Lorenzo, Buonerba et al. 2014). Die aktuelle Studienlage spricht für ein therapeutisches Potential, dass im Detail jedoch in großen randomisierten Studien weiter für Tumor-spezifische Überlebenszeit, Progressions-freies Überleben und Rezidiv-freies Überleben untersucht werden muss (May, Brookman-May et al. 2018).

2.6.7 VEGF

VEGF fördert die Angiogenese durch Kapillaraussprossung und Endothelproliferation. Diese Prozesse werden durch die Bindung von VEGF an die Endotheloberflächen-Rezeptoren Flt-1,4 und Flk-1 vermittelt. Eine Überexpression findet sich in einer Vielzahl solider Tumore und ist mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und ungünstigem Überleben assoziiert (Heidenreich, Thuer et al. 2008). VEGFR-3 und VEGF-C werden beim PeCa durch den E2F1-Transkriptionsfaktor hochreguliert, was mit Tumorinvasion, lymphatischer Dissemination und Chemotherapieresistenz korreliert (May, Brookman-May et al. 2018).

Therapeutisch eingesetzte Angiogenese-Hemmer sind bereits unter anderem für das Plattenepithelkarzinome der Lunge und des Oropharynx und das Adenokarzinom der Niere

zugelassen. Diese hemmen die Angiogenese etwa direkt durch einen monoklonalen Antikörper (bspw. Bevacizumab) oder indirekt durch eine Interaktion von Antikörpern oder TKI mit der EGF-Tyrosinkinase. Bislang fehlt es jedoch an repräsentativen randomisierten Doppelblind-Studien zu VEGF-Antikörpertherapien beim penilen SCC (Heidenreich, Thuer et al. 2008, May, Brookman-May et al. 2018).

2.6.8 SCCA

Das SCC-Antigen (Squamous Cell Carcinoma Antigen) ist ein Tumor-assoziiertes-Glykoprotein und ein Mitglied der Serin-Proteasen-Inhibitor-Familie. Es wird im Plattenepithel der Haut und Schleimhäute synthetisiert und kann im Serum durch ein Mikropartikel Enzym-Immunoassay gemessen werden. SCC-Ag1 inhibiert die Apoptose der Tumorzellen, die durch Tumormedikamente, TNF α oder NK-Zellen ausgelöst wird. SCC-Ag2 inhibiert Chymase und Cathepsin G aus Mastzellen und könnte so protektiv wirken, indem es Epithelzellen vor Protease induzierter Inflammation schützt (Kommu, Hadway et al. 2004)

Ein erhöhter Antigen-Spiegel wird bei Plattenepithelkarzinomen des Penis, der Urethra und der Blase; bei Adenokarzinomen der Niere und Prostata; bei Urothelkarzinomen der Blase und Keimzelltumoren des Hodens beschrieben. Patienten mit Anal- und Cervix-Ca zeigen ebenso ein erhöhtes Serum SCC-Ag, was nützlich für das Staging und Monitoring des Krankheitsverlaufs sein kann (Kommu, Hadway et al. 2004). Ein sequenzielles Monitoring des SCC-Ag Levels könnte auf die Entwicklung von Lymphknoten- und oder Fernmetastasen hinweisen und nützlich sein, um das Therapieansprechen zu verfolgen (Touloupidis, Zisimopoulos et al. 2007). Eine erhöhte Konzentration findet sich bei 25-45% der Patienten mit metastasiertem SCC des Penis, die Serumkonzentration korreliert dabei eng mit Krankheitsprogression und Therapieansprechen (Kommu, Hadway et al. 2004, Hakenberg, Compérat et al. 2018). Änderungen in der Serumkonzentration unter Therapie reflektieren den klinischen Verlauf der Patienten, besonders bei erhöhter Konzentration vor der Therapie. Die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins von Metastasen bei positivem Test sollte hoch genug sein, um die Morbidität unnötiger LAD zu kompensieren. Die vorhandenen Tests müssten hierzu ihren prädiktivem Wert für LKM von circa 20% auf wenigstens 80% anheben. Dann könnte das SCCA auf Metastasen hinweisen, bevor diese durch Bildgebung oder klinische Untersuchung detektiert werden. Die Möglichkeit zur frühzeitigen und potenziell kurativen inguinalen LAD würde dabei erhöht, während man gleichzeitig Übertherapie vermeidet. Das PeCa eignet sich hierbei auch als Testmodell für das Rezidiv-Monitoring in der Nachsorge, da

die Patienten routinemäßig in 2-monatigen Intervallen nach OP untersucht werden (Kommu, Hadway et al. 2004).

In einer klinischen Studie an 63 Patienten wurde der prognostischen Wert von SCCA (Normwert Cut-off $\leq 1,5 \mu\text{g/l}$) untersucht. 23,8% der Patienten hatten einen erhöhten SCCA-Spiegel, dies korrelierte positiv mit dem Auftreten von LKM. Allerdings konnten dadurch nicht präzise das Vorhandensein von LKM bei klinisch negativen LK vorhergesagt werden. Präoperativ war das SCCA ein unabhängiger Prognosefaktor für das DFS (disease free survival) in Patienten mit positiven Lymphknoten. Das SCCA war hierbei kein sensitiver Marker für die Tumorlast, aber prognostisch signifikant für das DFS bei Patienten mit PeCa die eine operative Therapie erhielten (Zhu, Ye et al. 2008).

Eine weitere Studie untersuchte die Relevanz von CRP- und SCCA in Beziehung zu klinisch-pathologischen Faktoren und Prognose des PeCa. Ein CRP- $\geq 4,5 \text{ mg/l}$ und SCC-Ag-Spiegel $\geq 1,4 \text{ ng/ml}$ waren beide signifikant mit inguinalen und pelvinen LKM, extranodaler Extension und DSS assoziiert. Eine kombinierte Messung von CRP und SCCA könnten als unabhängiger Biomarker für LKM, fortgeschrittenes Tumorstadium und DSS bei Patienten mit penilem SCC dienen (Li, Yao et al. 2016).

2.7 Therapie

Vor Therapiebeginn sollte immer eine histologische Sicherung und Befundung durch einen erfahrenen Urologen, am besten durch Mitbeurteilung in einem Referenzzentrum erfolgen. Die Einteilung des Tumors nach TNM und Grading erfolgt nach klinischer Untersuchung, dem Befund des Pathologen, sowie gegebenenfalls durch verschiedene Bildgebungsverfahren. Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollte innerhalb eines interdisziplinären Tumorboards eine evidenzbasierte stadiengerechte Therapie vorgeschlagen werden, die dann im Einklang mit dem Patientenwunsch und dessen Konstitution eingeleitet wird (Hakenberg, Compérat et al. 2018, AWMF 2020).

Über die Jahre hat sich der Standard in der chirurgischen Therapie von einem radikalen Vorgehen mit Amputationen, großen Sicherheitsabständen und radikaler Lymphknotenentfernungen wesentlich gewandelt. In der modernen Therapie gilt: So viel Organerhalt wie möglich, soviel Radikalität wie nötig. Je nach TNM-Stadium und Grading des Tumors betragen die Sicherheitsabstände einen bis wenige Millimeter. Dies führt zwar zum Teil zu häufigeren Lokalrezidiven, die jedoch nicht mit vermindertem Tumor-Gesamtüberleben

einhergehen und gleichzeitig mehr Lebensqualität bei geringerer psychosexueller Belastung bieten (Hakenberg, Compérat et al. 2018, AWMF 2020).

In frühen Stadien liegt die Überlebensrate über dem Durchschnitt anderer Tumore, während bei fortgeschrittener Erkrankung und aggressiven Tumoren eine hohe Rezidiv- und Tumor-assoziierten Mortalitätsrate zu beobachten ist (CSM, cancer specific mortality). Aktuell zeigt sich anhand von Tumorregisterdaten, dass sich in den letzten 20 Jahren sowohl in Europa als auch in den USA das relative Überleben nicht verbessert hat (May, Brookman-May et al. 2018).

2.7.1 Oberflächliche, nicht-invasive Peniskarzinome (CIS, PIN)

Das Carcinoma in situ stellt 10% aller neudiagnostizierten Peniskarzinome dar. Diese betreffen in 80% der Fälle die Glans penis. Diagnostisch sollte vor Therapiebeginn immer eine histologische Sicherung erfolgen, dies sollte mittels Mehrfachbiopsie, besonders bei großflächigen Tumoren erfolgen, da in 20-30% der Fälle stellenweise eine Invasivität vorliegt. Ziel der Behandlung ist es den Tumor in kurativer Absicht organ- und funktionserhaltend zu behandeln. Bei Tumoren der Vorhaut sollte eine Zirkumzision angestrebt werden, da diese meist bereits kurativ ist. Die Prognose ist bezüglich der lokalen Tumorkontrolle und des Karzinom-spezifischen Überlebens sehr gut. Therapieverfahren, wie beispielsweise Topika und Laserablationen, bei denen die Schnittländer nicht histopathologisch evaluiert werden und bei denen das Glansepithel weitgehend erhalten bleibt, sollten nach erfolgter Therapie eine Kontrollbiopsie erhalten. Das Auftreten von Lokalrezidiven wird in etwa 30% der Fälle beobachtet, kompromittiert jedoch bei entsprechender Sekundärtherapie nicht das Gesamtüberleben (OS) (AWMF 2020).

Topische Therapien können mit 5-Fluoruracil (5-FU) oder Imiquimod durchgeführt werden. 5-FU hemmt als ein Pyrimidin-Analogon die Thymidylat-Synthase. Es wird meist als Cream (0,5-4% 5-FU) in Kombination mit Salicylsäure appliziert. Imiquimod gehört zu den Imidazoquinolonen und wirkt immunmodulatorisch über eine Bindung an Toll-like Rezeptor 7 (TLR-7) und der anschließenden Aktivierung von Makrophagen mit Zytokin-Ausschüttung. Bei der Therapieeinleitung gilt es jedoch die engen Zulassungsbeschränkungen zu beachten, die dazu führen, dass die Therapie praktisch immer als „Off-Label-Use“ gilt und man die Patienten auch darüber informieren muss (Delgado, Elmaoued et al. 2008, Schneede and Schlenker 2018, AWMF 2020). Das ist auch der Grund wieso es keine definierten Standards zur Dosierung in Menge und Häufigkeit bei der Anwendung, sowie der Therapiedauer gibt. Insgesamt wird eine engmaschige Kontrolle unter der Therapie empfohlen, auch um mögliche Nebenwirkungen (schmerzhafte Erosionen, lokale Entzündungen) zu erfassen. Bei

Therapieversagen oder dem Auftreten eines Rezidivs (50-80% rezidivfreies Überleben) sollte die Therapie umgestellt werden (AWMF 2020).

Es existieren verschiedene medizinische Lasersysteme (CO₂-, Nd:YAG-, Ho:AG-, Tm:YAG-, KTP:YAG-, Argon- und Dioden-Laser), die sich in der Wirkungsweise auf das Gewebe und die Eindringtiefe unterscheiden. Die höchste Evidenz existiert für CO₂-Laser (schichtweise Verdampfung, Penetrationstiefe von 0,1mm) und Nd:YAG-Laser (Proteindenaturierung durch Koagulation, Penetrationstiefe bis 10mm). Auf Grund möglicher Spätrezidive auch noch 5-10 Jahren nach Therapieabschluss soll eine langfristige Nachsorge durchgeführt werden. Im Gegensatz zur Therapie mit Topika können Lokalrezidive (Rezidivrate 14-48%) erneut mit einer Lasertherapie behandelt werden (AWMF 2020).

Auch operative Verfahren wie das „Glans resurfacing“ können zur Behandlung flächiger CIS und PIN der Glans herangezogen werden. Nach der Abtragung des Epithels wird ein freies Hauttransplantat als Mesh-graft zur Defektdeckung genutzt. Diese Technik ermöglicht eine Schnittrandkontrolle, zufriedenstellende kosmetische sowie funktionelle Ergebnisse bei niedriger Lokalrezidivrate (4-4,5%) (Sohn, Dietrich et al. 2018, AWMF 2020).

2.7.2 Invasive Tumore der Glans (T1/T2)

Bei invasiven Tumoren der Glans im Stadium T1 und T2 existieren mehrere gleichwertige Therapieoptionen, abhängig von Lokalisation, Ausdehnung, Konstitution und Therapiewunsch des Patienten (AWMF 2020). Dazu sollte der histopathologische Subtyp und das Grading in die Therapieentscheidung einfließen, da diese Hinweise auf Tumoreigenschaften und Verhalten der Erkrankung geben (Hölters, Khalmurzaev et al. 2019). Mittels lokaler Exzision und partieller/kompletter Glansekтомie mit anschließender Rekonstruktion kann chirurgisch ein weitgehender Organerhalt ermöglicht werden. Durch die Möglichkeit einer Glansrekonstruktion mittels Spalthauttransplantaten, wie einem Mesh-Graft, das durch netzartige Inzisionen ein Vielfaches seiner Ursprungsgröße an Defekten decken kann, sind solche Verfahren mit guten ästhetischen Ergebnissen möglich. Kommt keine der organschonenderen operativen Verfahren in Betracht oder der Patient wünscht sich dies explizit kann auch eine Penisteilamputation durchgeführt werden. Die Lokalrezidivrate ist hierbei im Vergleich zur lokalen Exzision und Glansekтомie nochmals geringer. Generell gilt, dass bei operativen Verfahren eine Schnittrand-Kontrolle erfolgen sollte, dabei sind Sicherheitsabstände von einem bis wenige Millimeter ausreichend. Trotz der Reduktion der Abstände von zwei Zentimetern auf wenige Millimeter ist die Rate an Lokalrezidiven insgesamt niedrig und kompromittiert das CSS nicht (AWMF 2020). Agrawal und Kollegen beschreiben eine

Korrelation des nötigen Mindestabstands mit dem Grading des Tumors, so zeigten sie in ihrer Studie, dass eine schlechtere Tumordifferenzierung mit einer größeren Tumorausbreitung über die makroskopischen Grenzen hinaus einhergeht (Agrawal, Ananthakrishnan et al. 2000). Als nicht-operative Methode kann auch die lokale Strahlentherapie mittels Brachytherapie oder perkutaner Bestrahlung durchgeführt werden. Allerdings werden weltweit 95,8% der Peniskarzinome operativ behandelt, weswegen es international nur wenige Zentren gibt, die Erfahrungen in der Durchführung dieser Therapien haben. Die Brachytherapie kann als low-dose-rate (LDR), pulsed-dose-rate (PDR) oder high-dose-rate (HDR) durchgeführt werden und bietet eine zufriedenstellende lokale Tumorkontrolle und Gesamtprognose, die mit operativen Verfahren vergleichbar ist. Dabei werden starke Strahlenquellen wie Iridium-192 mittels Kanülen oder Schläuchen in den Penis eingebracht und der Tumor so aus nächster Nähe, gegebenenfalls auch in tieferen Schichten, bestrahlt. Tumore mit einer Größe über vier Zentimeter zeigten in einer Studie ein signifikant höheres Risiko für ein Lokalrezidiv. Die perkutane Bestrahlung hat eine schlechtere lokale Tumorkontrolle, bietet jedoch wie die Brachytherapie bei Therapieversagen die Möglichkeit im nächsten Schritt eine operative Salvagetherapie durchzuführen. Häufige Nebenwirkungen der Bestrahlung sind Meatusstenosen (4-43%), Teleangiektasien (48%), Atrophie der Glans (17%) und eine über das zerstörte Tumorgewebe hinausgehende Nekrose oder Fibrosierung des Penis (14-23%) (AWMF 2020).

2.7.3 Fortgeschrittene Tumore mit Invasion der Corpora cavernosa und benachbarten Strukturen (T3/T4)

Tumoren, die die Corpora cavernosa infiltrieren (T3) werden mit einer Penisteilamputation behandelt. Ausgedehnte Befunde oder noch weiter fortgeschrittene lokale Tumore (T4) werden mit einer radikalen Penektomie behandelt, wobei der Begriff jedoch nicht klar umschrieben ist. Meist wird darunter die Entfernung des äußeren Penis verstanden, rein anatomisch sollte allerdings der gesamte Schwellkörper, der über den Penis hinaus ins Becken ragt, entfernt werden. Um eine regelrechte Miktion zu ermöglichen wird ein Penisstumpf von etwa vier Zentimeter benötigt. Nach einer radikalen Penektomie ist die Anlage einer Boutonniere nötig. Diese chirurgisch angelegte Fistel zur Harnableitung verbindet die Urethra mit dem Perineum und mündet zwischen After und Skrotum. Bei so weit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen ist eine Lymphknotenbeteiligung oder gar eine Fernmetastasierung häufig, so dass auch auf ein adäquates Management mittels operativer Verfahren und/oder neo-/adjuvanter Chemotherapie zu achten ist (AWMF 2020).

2.7.4 Chemotherapie

Beim Auftreten von Fernmetastasen sollte, abhängig von Allgemeinzustand, Tumorlast und Therapiewunsch des Patienten, ein palliatives Therapiekonzept angestrebt werden. Zur Therapiefähigkeit des Patienten können Bewertungssysteme (Karnofsky-Index, ECOG-Performance-Status) zur Hilfe gezogen werden, die die Selbstständigkeit und Aktivität im Alltag bewerten. Bei einem guten Allgemeinzustand (ECOG<2) kann eine Systemtherapie zur Lebensverlängerung und Symptomkontrolle beitragen. Empfohlen wird in der Erstlinie eine Kombinationstherapie aus Cisplatin, Ifosfamid und Paclitaxel, alternativ kann auch eine Kombination aus Cisplatin und 5-FU genutzt werden. Es gibt keine Standardtherapie in der Zweitlinie, in der klinischen Anwendung wird jedoch häufig Paclitaxel als Monotherapie eingesetzt. In einer Phase-II-Studie lag die Ansprechrates jedoch unter 30% und es konnte keine Überlebensverlängerung erzielt werden. Es werden unterschiedliche Ansprechrates auf die Chemotherapie beschrieben, meist liegen diese bei 30-38%. Bei einem Rezidiv der Metastasen nach primärer Chemotherapie ist die Prognose schlecht, das Überleben beträgt weniger als 6 Monate (AWMF 2020).

2.7.5 Immuntherapie und Proteinkinaseinhibitoren

Zielgerichtete Therapeutika wie Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) und Checkpoint-Inhibitoren haben bisher keine Zulassung für die Anwendung beim Peniskarzinom und Studienergebnisse zu diesen sind ebenfalls spärlich (AWMF 2020). Als SCC exprimiert auch das PeCa EGFR, das in der Studie von Necchi und Kollegen als therapeutischer Angriffspunkt für Dacomitinib (pan-HER TKI) genutzt wurde (Necchi, Lo Vullo et al. 2018). Hier konnte eine ORR von 32% bei 28 behandelten Patienten erzielt werden, insgesamt konnte bei 60,7% eine bildmorphologische Reduktion der Tumormasse und sogar in einem Fall eine Complete Response (CR) erreicht werden. Udager und Kollegen konnten eine PD-L1-Expression $\geq 5\%$ bei 62% ihrer Patienten nachweisen, diese Patienten zeigten häufiger eine Metastasierung und ein schlechtes Outcome (Udager, Liu et al. 2016). Klinisch relevante Studien mit PD-L1-Antikörpern existieren bislang allerdings nicht. In einem Fallberichte von Su und Kollegen konnte unter Therapie mit Toripalimab (PD-1-Ak) ein PFS von 10 Monaten bei einem Patienten mit Tumorprogress nach initialer operativer Therapie und späterer Radiochemotherapie bei inguinalen und pulmonalen Metastasen erreicht werden (Su, Zhang et al. 2020).

2.7.6 Palliative Strahlentherapie

Eine palliative Strahlentherapie kann eine Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle und eine Verminderung der Symptomlast ermöglichen. Häufige Indikationen sind postoperative

Lymphfisteln nach Lymphadenektomie, Kompression von Blut- und Lymphgefäßen bei großen inguinalen Lymphknotenmetastasen mit konsekutiven peripheren Ödemen und exulzierenden Tumoren mit Blutungen (AWMF 2020).

2.8 Prognose

Das Vorhandensein von detektierbaren Metastasen oder übersehenen Mikrometastasen in den regionalen Lymphknoten der Leiste und des Beckens gelten als der wichtigste prädiktive Marker für eine schlechte Prognose. Eine detailliertere Risikostratifizierung erfolgt über die Anzahl der Tumor-positiven LK (uni-/bilateral), die generelle Beteiligung pelviner LK, eine Tumorextension über die Lymphknotenkapsel und maximale Metastasengröße. Pathologische und molekulare Erkennungsmerkmale von primären Tumoren könnten dabei helfen das Risiko von LKM vorherzusagen, wobei es hierbei zurzeit keine etablierten Möglichkeiten gibt. Der histologische Subtyp, das Grading, eine Invasion von lymphatischen und venösen Gefäßen, eine in der Bildgebung festgestellte Kapselüberschreitung, die Tumordicke und das Wachstumsmuster sind die wichtigsten Variablen, um das Auftreten von LKM vorherzusagen (AWMF 2020). Diese Parameter müssen in den pathologischen Befund beim Staging des Patienten eingeschlossen werden. Prädiktive Modelle wie Nomogramme können prognostische Informationen der wichtigsten klinischen und/oder pathologischen Variablen vereinen. Diese erlauben eine Verbesserung der prognostischen Genauigkeit im Vergleich zur Betrachtung einzelner Variablen. Der Nutzen in der klinischen Praxis ist jedoch potenziell limitiert durch das Fehlen externer Validierung. P53, E-cadherin, MMP-2, MMP-9 sind aktuell die vielversprechendsten molekularen Prognosefaktoren für das Auftreten von LKM, jedoch bedarf es hierzu zusätzliche Bestätigung der Forschungsergebnisse aus der klinischen Praxis (Ficarra, Akduman et al. 2010).

2.9 Humane Papillomviren

2.9.1 Epidemiologie

Humane Papillomviren sind weltweit verbreitet und infizieren sowohl Frauen als auch Männer. Es ist davon auszugehen, dass es sich um eine der häufigsten sexuell übertragbaren Krankheiten handelt, da eine Infektion meist mit Beginn der ersten sexuellen Handlungen stattfindet. Auch perinatale Übertragungen sind möglich (Trottier, Mayrand et al. 2016). Risikofaktoren für eine Infektion sind eine hohe Anzahl früherer Sexualpartner, häufiger Partnerwechsel, sexuelle Aktivitäten zwischen Männern und ein kompromittiertes Immunsystem, beispielsweise durch eine zusätzliche HIV-Infektion, iatrogene Immunsuppression oder Erkrankungen wie SCID

(Severe combined immunodeficiency) oder EV (Epidermodysplasia verruciformis). In einer schwedischen Studie konnte gezeigt werden, dass sich das Risiko für eine Infektion mit HPV16 linear um 4% für jeden sexuellen Partner bis zu einem Plateau von 32% erhöht (Nielsen, Holm-Nielsen et al. 2000). Für Männer in monogamen heterosexuellen Beziehungen konnte eine höhere Prävalenz von HR-HPV gezeigt werden, wenn die Frauen eine vorbestehende CIN oder Cervix-Ca aufwiesen. Es bestehen regionale Unterschiede bedingt durch eine geringe medizinische Aufklärung der Bevölkerung zur Prävention und schlechteren Zugang zum Gesundheitssystem mit Screening-Untersuchungen, Behandlungsoptionen möglicher HPV-Infektionen (Genitalwarzen oder dysplastischen Veränderungen) und Impfstoffen. Bei penilen Wischtests und anschließender PCR-Sequenzierung konnte in Kolumbien, einem Hochrisiko-Gebiet für Penis- und Cervix-Ca, fünffach häufiger HPV-DNA nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe in Spanien. Die Prävalenz von HPV-DNA bei diesen Tests liegt in Westeuropa bei ca. 5% (Nielsen, Holm-Nielsen et al. 2000). Insgesamt gilt es jedoch zu beachten, dass sowohl HR- als auch LR-HPV-Infektionen und auch Precursor-Läsionen (CIN, PIN) eine hohe Rate an spontaner Clearance aufweisen. Dabei wird weiterhin stark diskutiert, ob eine fehlende Nachweisbarkeit das komplette Ausheilen der Infektion oder nur eine latente Infektion unter der Detektionsgrenze bedeutet (Gravitt and Winer 2017). HPV-assoziierte Malignome stellen mit einer halbe Millionen Toten pro Jahr weltweit eine Herausforderung für die Menschheit und die versorgenden Gesundheitssysteme dar. Auch nach der Einführung von Impfstoffen zeigt sich ein Anstieg HPV-positiver Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, so dass diese auch in Zukunft einen beträchtlichen Teil der Kopf-Hals-Tumore ausmachen werden (Westrich, Warren et al. 2017).

2.9.2 Virus-Aufbau und Struktur

HPV ist ein unbehülltes Virus mit einer 8 Kilobasen (kb) langen zirkulär konfigurierten Doppelstrang-DNA, die in einem ikosaedrischen Kapsid eingeschlossen ist und aus der Familie der Papillomaviridae stammt. Über 200 Genotypen konnten bisher identifiziert werden, die in 5 Genera unterteilt nach dem griechischen Alphabet benannt wurden: Alpha, Beta, Gamma, Mu und Nu. Davon sind etwas mehr als 150 humane HPV-Typen. Medizinisch unterteilt man die Viren nach ihrem onkogenen Potential in HR- und LR-HPV, wobei es zu beachten gilt, dass auch LR-HPV Typen Tumorerkrankungen verursachen können und es diverse Variablen gibt, die das Risiko der infizierten Person erhöhen oder vermindern. Unter den Genera zeichnen sich die Alpha-Viren dadurch aus, dass sie neben der Haut, auch die Mukosa infizieren können (Brianti, De Flammineis et al. 2017, Szymonowicz and Chen 2020).

Das Virusgenom wird als Episom in die Zelle eingebracht und kann dort episomal, als auch in das Wirtsgenom integriert replizieren. Hier kann das virale Genom manchmal nur mit der zellulären DNA gemeinsam replizieren oder es wird nur in Teilen vervielfältigt. Das Genom selbst kodiert für das Kapsidprotein der späten Region (L1/2) und die Proteine der frühen Region (E1-E7) zur Replikation, Transkription und Transformation (Brianti, De Flammeneis et al. 2017). Das Kapsidprotein setzt sich aus 72 pentamerischen Kapsomeren aus dem L1 Protein mit L2 Protein-Monomeren im Zentrum zusammen (Graham and Faizo 2017). Dazu kommen wichtige nicht-kodierende regulatorische Abschnitte wie die long control region (LCR) mit ihren Promotoren (PE = früher Promoter/PL = später Promoter), die sowohl Gentranskription der frühen und späten Region steuern. Sequenzen mit cis-Elementen regulieren die Polyadenylierung (PAE/PAL = frühe/späte Polyadenylierungsstellen) und die mRNA-Stabilität (Doorbar, Quint et al. 2012, Graham and Faizo 2017).

2.9.3 Viraler Lebenszyklus (Infektionsweg, Inkubationszeit, Replikation)

Die Infektion findet in der Regel über direkten Körperkontakt zwischen Menschen statt. Hauptübertragungsweg sind dabei Mikrotraumata der Haut und Schleimhäute, die bei vaginalem oder analem Sexualverkehr entstehen. Durch orogenitalen Verkehr können Infektionen der Mundhöhle und des Pharynx entstehen. Seltener können Schmierinfektionen und so auch perinatale Infektionen, vor allem bei klinisch auffälligen Infektionen mit Kondylomen, auftreten. Abhängig vom Genus des Virus und dem dadurch bestimmenden Gewebstropismus dringt das Virus durch das verletzte Epithel bis in die Basalzellschicht vor, da eine Infektion dieser sich dauerhaft teilenden Zellen essenziell für das Überleben des Virus ist (Brianti, De Flammeneis et al. 2017). Dem gegenüber steht die physikalische Barriere von Haut und Schleimhäuten sowie diverse Abwehrmechanismen wie Sekrete mit antimikrobiellen Peptiden. Hierbei spielen Endoproteasen, die das zum Eindringen in die Wirtszelle notwendige Furin spalten, und Phagozyten, die das Virus aufnehmen und verdauen, sowie Defensine eine tragende Rolle (Westrich, Warren et al. 2017).

Die Inkubationszeit bis zum Auftreten klinischer Symptome wie Genitalwarzen, dysplastischer Veränderungen oder gar Tumoren ist unterschiedlich und hängt unter anderem davon ab, ob eine Infektion mit HR- oder LR-HPV-Typen vorliegt. Dazu gilt es zu beachten, dass viele der Infektionen nur transient und inapparent bleiben (5-8 Monate), während länger andauernde Infektionen mit latenter oder persistierender Virusreplikation mit subklinischer Symptomatik, den permissiven Verläufen mit ausgeprägter Replikation und transformierenden Vorgängen gegenüberstehen (Schneede and Schlenker 2018). Während Kondylomata acuminata bereits

nach 2-3 Monaten auftreten, vergehen bis zur Entstehung bzw. Diagnose zervikaler Dysplasien 3-6 Jahre. Sollten diese persistieren und nicht durch eine iatrogene Intervention oder die körpereigene Immunantwort beseitigt werden, kann sich daraus über einen Zeitraum von einem bis drei Jahrzehnten ein Cervix-Karzinom entwickeln. Für Männer gibt es deutlich weniger Studiendaten, die sich mit der Latenzzeit zwischen Infektion und Entwicklung einer PIN oder eines Peniskarzinomes beschäftigen. Da Peniskarzinome nach der altersstandardisierten Inzidenz am häufigsten im siebten Lebensjahrzehnt auftreten, ist es jedoch auch anzunehmen, dass eine Infektion bei HPV-assoziierten Tumoren über längere Zeit bestehen muss oder wiederholt eintreten (Doorbar, Quint et al. 2012, Brianti, De Flammoneis et al. 2017).

Der Viruseintritt beginnt nach Ankunft an der Zielzelle mit der Bindung des L1 Kapsidproteins an Heparansulfat-Proteoglykane auf der Basalzelloberfläche. Anschließend erfolgt die Virusaufnahme über Mikropinozytose. Nicht alle Mechanismen des Rezeptor-abhängigen Eintritts sind bekannt, auch andere Proteine wie EGFR, Integrin $\alpha 6$, Tetraspanin-reiche Transmembrandomäne, Laminin und Annexin-A2 Heterotetramere sind daran beteiligt. Über das Zytoplasma gelangt das Virus dann weiter zum Golgi-Apparat, über den es den Zellkern innerhalb von 24h erreicht. Das Eindringen in den Zellkern erfolgt wahrscheinlich beim Zusammenbruch der Kernmembran. Bei der initialen, durch die viralen Replikationsproteine E1/2 gesteuerte, Amplifikation entstehen so 50-100 Viruskopien. Bei nachfolgenden Zellteilungen führt die Bindung von E2 an zelluläre Proteine wie Brd4 zur Weitergabe des gleichsam an das Chromatin gehaftete virale Genom an die neuentstehenden Tochterzellen (Graham and Faizo 2017). Durch die Integration des HPV-Genoms in die Chromosomen der Wirtszelle entsteht häufig ein Verlust oder eine Zerstörung der E2-Sequenz, was durch die daraus resultierende fehlende negative Feedback-Schleife zu einer Überregulation der Onkoproteine E6 und E7 führt. Virale Transkripte der integrierten Form sind stabiler als solche die episomal exprimiert werden (Woodman, Collins et al. 2007). Mittels PCR kann man überprüfen, ob eine vollständige Amplifikation von E2 möglich ist. Auch eine Hybridisierung durch einen Southern Blot stellt eine etablierte Methode dar (Woodman, Collins et al. 2007). Die Tochterzellen können lokal in der Basalzellschicht bleiben oder auch in die suprabasalen Schichten migrieren, was über die Zeit zu einer mehrschichtigen dysplastischen Veränderung führen kann. Die Expression der frühen Virusproteingen-Region verändert sich bei mit der Lage der infizierten Zelle in der Haut und Schleimhaut. Dabei scheint die Kontrolle über read-through-Mechanismen der Polyadenylierung eine wichtige Rolle beim Wechsel der Genexpression von der frühen zur späten Virusproteingen-Region zu spielen (Graham and Faizo 2017).

2.9.4 Virale Onkoproteine und Karzinogenese

Die viralen Onkoproteine inaktivieren Tumorsuppressoren, entkoppeln physiologische Regulationsmechanismen des Zellzyklus, hemmen die Apoptose der Wirtszellen, führen zu Veränderungen in der Immunantwort und verursachen ein immunsuppressives Milieu durch Zytokine und Chemokine. Interleukine (IL) wie IL-1 β könnten in späteren Phasen dann durch chronische Inflammation die Tumorgenese fördern. Durch diese komplexen Eingriffe in die Homöostase der Zelle können sich über Jahre hinweg Mutationen im Genom der Wirtszelle akkumulieren, bis diese sich zu einem manifesten Tumor entwickeln. Die Expression der einzelnen Onkoproteine verändert sich über die Zeit der Expression und die epithelialen Schichten, durch die die infizierten Tochterzellen nach oben migrieren (Westrich, Warren et al. 2017).

In gesundem Epithel wird die Zellteilung der basalen und parabasalen Zellen durch Wachstumsfaktoren reguliert, die die Aktivierung der G1-Cycline mit CyclinD/Cdk stimulieren. CyclinD/Cdk phosphoryliert pRb und löst die Bindung zu E2F, was die Transaktivierung von Genen möglich macht, die zum Übergang in die S-Phase notwendig sind. Dabei ist p16^{INK4a} ein Marker für die negative Feedback-Schleife, die die CyclinD/Cdk-Aktivität unterdrückt und so eine eigene Überexpression, sowie die von E2F-aktivierten Genen hemmt (Doorbar, Quint et al. 2012).

Bei LR-HPV-Infektionen spielen E6 und E7 vor allem in den gutartigen Läsionen dieser Typen eine Rolle, indem sie die Zellteilung und die Genamplifikation oberhalb der Basalschicht antreiben. Um dies zu tun, bindet E7 an p130 aus der Rb-Familie und ersetzt dieses, sowie E2F4/5 an den Promotern, was dann schließlich die Genexpression in der S-Phase ermöglicht. Die Läsionen entstehen wahrscheinlich an den durch Mikro-/Traumata entstandenen Eintrittspforten des Virus. Hier könnte die lokale Wundheilung mit der Immunantwort des lokalen Mikromilieus in der Interaktion mit den infizierten Zellen die initiale Proteinexpression und Proliferation beeinflussen (Doorbar, Quint et al. 2012).

Bei HR-HPV-Infektionen hat E7 die zusätzliche Funktion E2F4/5 von Rb und p130 zu entfernen, ohne dass dazu eine Phosphorylierung von Rb notwendig ist. Das Fehlen effektiver Inhibitoren des Zellzyklus durch p16^{INKA4} kann zu seiner Akkumulation in der Zelle und zu einer Erhöhung von MCM, Ki-67 und PCNA durch das infizierte Epithel hindurchführen. Normalerweise führt MDM zur Degradation von p53, diese Funktion wird aber durch das ebenfalls erhöhte p14arf gestört, was in einer Überexpression von p53 mündet. Dessen Funktion

wird aber wiederum durch die hohe Expression von E6 in den proliferierenden Zellen gehemmt (Doorbar, Quint et al. 2012).

Auch wenn die genaue Rolle von E1 und E2 noch nicht vollständig geklärt ist, weiß man, dass sie eine entscheidende Rolle bei der initialen Amplifikation spielen. So erhöhen die E1 Proteine die virale Genomreplikation, während E2 die Expression von E6 und E7 reguliert und vermindert. Der Verlust der E2 Regressionsfunktion führt zur Deregulation von E6 und E7 (Doorbar, Quint et al. 2012).

E4 scheint eine Rolle in der Ausbreitung der Infektion zu spielen, in dem es Zytokeratin-Filamente umstrukturiert und so aus differenzierten Zellen die neu entstandenen Virionen freigesetzt werden. Es könnte auch zur Genom-Amplifikation beitragen und die Virion Synthese als solche antreiben (Graham and Faizo 2017).

E5 spielt eine wichtige Rolle für den Verlauf der Infektion, stimuliert Zellwachstum und schützt vor Apoptose. Dazu ist es in der Lage die MHC-Antigen Präsentation viraler Peptide zu unterdrücken, so dass das Virus vom Immunsystem länger unerkant bleibt. Seine verschiedenen Rollen im Lebenszyklus des Virus und die niedrigen Expressionslevel des Proteins erschweren bisher eine vollständige Erklärung seiner Funktionen (Graham and Faizo 2017).

E6 aktiviert eine Ubiquitin-abhängige Protease (E6AP), die den Tumorsuppressors p53 inhibiert. Es bindet an den Transkriptionsfaktor myc, reguliert über autokrine Motilitätsfaktoren Zelladhäsion und mittels Paxillin Zellpolarität. Der Apoptose-induzierende Faktor Bcl2 wird gehemmt und beeinflusst das für die DNA-Replikation essenzielle MCM7. Auch die Telomerase-Aktivität kann durch das Onkoprotein gesteigert werden (Brianti, De Flammineis et al. 2017, Buonerba, Pagliuca et al. 2017).

E7 inaktiviert das Tumorsuppressor-Protein pRb (Retinoblastom-Protein) durch Proteasomen-abhängige Degradation und verursacht dadurch eine Überexpression von p16^{INKA4a}, das als verlässlicher Marker für HR-HPV-Infektionen, zum Beispiel auch bei PIN und invasiven Läsionen, dient. Eine Herunterregulation von CXCL24 durch E7 führt zur verminderten NK- und T-Zellinfiltration im Tumor und den drainierenden Lymphknoten. Die Transkription des Wirtsgenoms wird durch die Interaktion zwischen dem E7 Protein mit der Histon-Deacetylase moduliert und aktiviert, wenn diese von ihren Promotern entfernt wird (Brianti, De Flammineis et al. 2017, Buonerba, Pagliuca et al. 2017, Westrich, Warren et al. 2017).

HPV-infizierte Zellen der unteren und mittleren Epithelschicht exprimieren E6 und E7, die die differenzierten Zellen der suprabasalen Schicht zur Teilung und den Wiedereintritt in die S-Phase anregen. In der mittleren Schicht unterstützen HPV-infizierte teilungsfähige Zellen die virale DNA-Replikation durch die Rekrutierung von E2/E1 Komplexen. Dazu ist eine Expression von E4 typisch in der S- oder G2-Phase dieser Zellen. In den oberen Schichten verlassen die Zellen den Zellzyklus, während eine Untergruppe der E4 positiven Zellen L1/2-Kapsidproteine exprimiert, in die das amplifizierte Virusgenom gepackt werden kann. Die HPV-Infektion kontrolliert das zelluläre Splicing, um den viralen Lebenszyklus der differenzierten Zellen zu komplettieren. Alternatives Splicing erlaubt die Expression multipler Proteine bei einem kleinen Genom, nur hiermit ist eine korrekte Balance zwischen E6 und seinen Isoformen, E7 und den Kapsidproteinen während der epithelialen Differenzierung möglich. Eine aberrante Methylierung von CpG-Inseln der Promotor-Regionen von Tumorsuppressorgenen kann durch die resultierenden epigenetischen Veränderungen ebenfalls zur Karzinogenese beitragen (Woodman, Collins et al. 2007, Doorbar, Quint et al. 2012, Graham and Faizo 2017).

2.10 S100-Proteine

2.10.1 Aufbau und Struktur

Die Proteine der S100-Familie wurden erstmals aus Rinderhirnen extrahiert und nach ihrer Eigenschaft, in 100% gesättigtem Ammoniumsulfat löslich zu sein, benannt (Moore 1965). Die 25 verschiedenen Proteine haben eine ungefähre Größe von 10.000 Dalton und teilen die gemeinsame Eigenschaft zu den Kalzium-bindende Proteine vom EF-hand-Typ zu gehören. Neben den beiden EF-hands bestehen die Proteine aus 4 α -Helix Segmenten, einer zentralen hinge-Region mit variabler Länge und einer N- und C-terminalen variablen Domäne. 22 davon sind auf dem Genlokus 1q21 kodiert, wovon 14 zum epidermalen Differenzierungskomplex (EDC) gehören. Sie besitzen die Eigenschaft *in vitro*, wie *in vivo*, Hetero- und Homodimere miteinander zu bilden. Durch Konformationsänderung können sie mit verschiedenen Proteinen interagieren und werden sowohl intra- als auch extrazellulär exprimiert, wodurch sich auch unter anderem ihre vielfältigen Funktionen erklären lassen (Wang and Wang 2010, Chen, Xu et al. 2014, Wang, Song et al. 2018).

2.10.2 Physiologische Funktionen

S100A8 und A9 nehmen evolutionär als Teil des EDC eine Schlüsselrolle in dem Aufbau und dem Erhalt der epidermalen Barriere ein. Insbesondere die Differenzierung der Keratinozyten

im Stratum corneum als oberste Schicht der Epidermis sowie verschiedene regulatorische Maßnahmen im Rahmen von Entzündungen und Immunantwort werden durch die S100-Proteine reguliert (Strasser, Mlitz et al. 2014). Sie sind auch als Macrophage migration inhibitory factor-ähnliche Proteine (MIF8/14) bekannt und werden in myeloischen Zellen wie Monozyten und Neutrophilen exprimiert. Als Heterodimer-Komplex tragen die beiden zur myeloischen Zelldifferenzierung bei und zeigen antimikrobielle Effekte (Zhang, Wang et al. 2017). Daneben existieren aber auch Homodimere und Oligomere höherer Ordnung, die in epithelialen Zellen, glatter Muskulatur und Fibroblasten bei inflammatorischem Geschehen oder durch Karzinogenese exprimiert werden. Calgranulin (S100A8/A9/A12) wird aktiv durch einen alternativen Signalweg des klassischen Golgi-Systems sekretiert. Durch diese Art der Sekretion wird eine zelluläre Homöostase erreicht, bei der die Faktoren im physiologischen Zustand intrazellulär verbleiben und erst bei inflammatorischem Geschehen oder Stress-Signalen zu Damage-associated molecular pattern (DAMPs) werden und eine Reaktion verursachen (Funk, Mark et al. 2015). S100-Proteine besitzen keine intrinsische Aktivität, können aber durch Kalzium-Bindung eine Konformitätsänderung mit anschließender Modulation der biologischen Aktivität hervorrufen. So ist es möglich, dass die verschiedenen Proteine eine Vielzahl von Peptiden binden können. Neben Kalzium könnten auch Kupfer- und Zink-Bindung eine regulierende Funktion haben (Wang and Wang 2010). Auf intrazellulärer Ebene können S100A8/A9-Komplexe zur Modulation des Zytoskelettes und des Aminosäure-Metabolismus beitragen, sowie Schutzfunktion gegen Pathogene leisten (Wang, Song et al. 2018). Extrazelluläre S100A8/A9-Proteine binden an TLR4 und RAGE, wodurch es zu einer NF- κ B-, MAP-Kinase- und JAK-STAT-Aktivierung und Produktion proinflammatorischer Zytokine kommt. In anderen Studien wurden auch antiinflammatorische Effekte bei LPS-induzierter Sepsis und autoimmunbedingter Myokarditis beschrieben (Yang, Anholts et al. 2018).

2.10.3 Rolle in chronisch inflammatorischen Prozessen und Karzinogenese

Eine regelhaft erhöhte Expression von S100A8 und S100A9 konnte in schlecht differenzierten invasiven duktalem Karzinomen der Mamma nachgewiesen werden. Die Tumor-induzierte Hochregulierung von S100A9 scheint eine wichtige Rolle in der Rekrutierung und Akkumulation myeloischer Suppressorzellen (MDSC) zu spielen und ist assoziiert mit der Inhibierung der Differenzierung von dendritischen Zellen bei Brustkrebs. Des Weiteren scheinen beide Proteine in der Formierung einer prämetastatischen Nische in verschiedenen Organen zu spielen. Auch konnte eine Erhöhung der Chemoresistenz bei Tumoren der Brust

durch die Aktivierung von ERK1/2 und dem RPS6KB1-Pathway (ribosomal protein S6 kinase beta) nachgewiesen werden, die das Tumorzellüberleben begünstigen. Mehrere Proteine der S100-Proteine können direkt an p53 binden und inhibieren die Expression sowie die Phosphorylierung, wodurch Tumorzellen Stammzell-artige Eigenschaften erwerben, die die Chemoresistenz und die Tumorprogression fördern (Zhang, Wang et al. 2017). Bisher wurde keine Korrelation der S100A8/A9-Expression zu histopathologischen Faktoren in größeren Patientenkohorten untersucht (Funk, Mark et al. 2015). Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, rheumatoider Arthritis, zystischer Fibrose, Psoriasis und atrophischer Dermatitis können ebenfalls hohe serologische Spiegel an S100A8 und S100A9 gemessen werden. Epithelialen Zellen produzieren IL-1a, welches sowohl die S100A9-Expression als auch die zelluläre Differenzierung steuert. S100 A8 und A9 induzieren wiederum selbst durch die Expression von IL-6, IL-8 und MCP-1 (C-C Chemokin-Familie) eine Veränderung der physikalischen Barriere der Haut und modulieren die Migration und Invasion durch Makrophagen, T-Gedächtniszellen und NK-Zellen (Kim, Im et al. 2019).

Durch Einflussnahme von HPV kann die Expression von S100 verändert und so beispielsweise eine chronische Entzündung befeuert und über Zeit die Entstehung von Hauttumoren begünstigt werden. Patienten die an der erblichen Hauterkrankung Epidermodysplasia Verruciformis (EV) leiden zeigen eine drastisch gesteigerte Empfindlichkeit der Haut gegenüber HPV Infektionen. Die Infektionen können vom Körper nicht reguliert werden und die Patienten entwickeln über die Lebenszeit einen ausgedehnten Befall der Haut mit Makulae, warzigen Läsionen und auch Hauttumore. Podorska und Kollegen untersuchten Gewebeproben von Erkrankten und führten in vitro Experimente an Vorhautkeratinozyten (NFK) durch (Podgorska, Oldak et al. 2018). Hierbei zeigte sich, dass E6/E7 keine Hochregulation von S100A8/A9 fördert, sondern eher die physiologische Differenzierungs-assoziierte Expression unterdrückt. Dagegen steigerte das HPV8-E2-Protein die Expression von S100A8 und S100A9 in Keratinozyten von Patienten mit EV. Auch ein Einfluss auf Chemotaxis und die Rekrutierung von Granulozyten konnten gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass E2 über verschiedene Mechanismen auf die Immunantwort einwirken kann, indem es entzündungsfördernde Moleküle wie S100A8/A9 reguliert und so ein Milieu der chronischen Entzündungen fördert und Tumorgenese begünstigt (Podgorska, Oldak et al. 2018).

2.10.4 Einfluss auf Immunzellinvasion und Tumormikromilieu

Die besondere Struktur von S100A8/A9 verleiht den Proteinen das Potential eine Vielzahl an Funktionen zu übernehmen, abhängig von ihrer Konzentration, ihrer posttranslationalen

Modifikation, ihrer oligometrischen Form und dem umgebenden Mikromilieu der jeweiligen Lokalisation (Wang, Song et al. 2018). Darunter fällt auch die Rolle in der Tumorgenese, der Metastasierung, dem Tumormikromilieu, sowie der Erhaltung pluripotenter Stammzellen und so ihrem Potential als Biomarker und prognostischer Faktor. Durch ihre intra- sowie extrazelluläre Expression können sie eine wichtige Schlüsselrolle in fundamentalen zellulären Prozessen wie der Proliferation, Apoptose und der Metastasierung von Tumorzellen spielen. Durch den Anteil am EDC sind die Proteine in der Lage die Zelldifferenzierung zu regulieren und so zur Dedifferenzierung beizutragen. Die intrazellulären Proteine können mit p53 interagieren und so die transkriptionelle Aktivität und damit die p53-vermittelte Zellzyklusregulation und Proliferation beeinflussen. Extrazelluläre S100 Proteine können mit dem RAGE-Pathway interagieren und in der Aktivierung von MAPK, NF- κ B und JAK-STAT beteiligt sein (Chen, Xu et al. 2014).

S100 beeinflusst nicht nur die Tumorzelle selbst, sondern auch die Interaktion zwischen Tumor- und Stromazellen. Jeder Tumor wird von einer Vielzahl von Zellen umgeben: Fibroblasten, Endothelzellen, infiltrierende lymphatische und myeloische Immunzellen wie Leukozyten, Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM), Neutrophilen, MDSC und mesenchymale Stammzellen. Eine erhöhte S100A8/A9-Expression wurde in Tumor-infiltrierenden myeloischen Zellen epithelialer Tumore gefunden. Als Mediatoren chronischer Inflammation können sie so nicht nur die Tumorgenese initiieren, sondern auch zur Promotion und Progression beitragen. Durch die S100A8/A9 stimulierte Infiltration myeloischer Zellen wandern Neutrophile in den Tumor ein, die eine Inflammation weiter vorantreiben. Die S100A9-Expression konnte bei MDSC nachgewiesen werden, diese unterdrückt die adaptive Immunantwort durch die Blockade CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Dabei ist das Ganze ein sich selbst unterhaltender Prozess, da MDSC selbst S100A8/A9 sekretieren und S100A9 wiederum zur Akkumulation von MDSCs in Tumoren führt und die Differenzierung von dendritischen Zellen hemmt. Vom Tumor produzierte Wachstumsfaktoren wie TNF- α , TGF- β und VEGF-A können die S100A8/A9-Expression stimulieren, was dann wiederum eine inflammatorische prämetastatische Nische für den Tumor schafft. Dazu kann die Co-Expression der S100 Proteine die Aktivierung von ROS (reaktive Sauerstoff-Spezies) -abhängigen Signalwegen initiieren und die Tumorzellen vor dem Zelltod schützen (Chen, Xu et al. 2014).

In der Studie von Yang und Kollegen wurden myeloische Zellen untersucht, hier konnte die Expression von S100A8/ A9 primär in klassischen Monozyten, in deutlich geringerem Ausmaß aber auch in intermediären und nicht-klassischen Monozyten nachgewiesen werden (Yang,

Anholts et al. 2018). Alle S100A9 positiven Zellen exprimierten HLA-DR an der Zelloberfläche. Eine kleine Population (<3%) konnte als myeloische Suppressorzellen charakterisiert werden (CD14⁺, CD11b⁺, CD33⁺, HLA-DR⁺), die alle in hohem Maß S100A9 exprimiert haben. Diese sind in der Lage die T-Zell-Antwort zu unterdrücken. Die Überexpression von S100A8 und A9 in Makrophagen führt zur verstärkten ROS-Produktion und mRNA-Expression von antiinflammatorischem IL-10. S100A9 inhibiert die Differenzierung von dendritischen Zellen und Makrophagen und induziert eine Akkumulation von MDSC durch die erhöhte ROS-Produktion. Durch die Bindung an Glykoprotein-Rezeptoren der MDSC wird eine Migration und Akkumulation gefördert. Eine Akkumulation bei Patienten mit Nierentransplantation wurde beobachtet, diese waren in der Lage die Entwicklung regulatorischer T-Zellen in vitro zu induzieren. Patienten mit höherer Zahl an MDSC in ihrem Blut während einer akuten Transplantatabstoßung hatten dabei einen besseren Verlauf. S100A9⁺ myeloische Zellen haben zusammengefasst ausgeprägte immunregulatorische Eigenschaften. S100A9 könnte einen neuen Marker für humane MDSC darstellen (Yang, Anholts et al. 2018).

2.11 Cluster of differentiation 147 (CD147)

2.11.1 Aufbau und Struktur

CD147, auch bekannt als Basigin oder EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer), ist ein membranständiges Glykoprotein und Teil der IgSF. Es lässt sich in einer Vielzahl von Zellen und Organen von Vertebraten in verschiedenen Stadien der Entwicklung nachweisen, so beispielsweise in embryonalen und adulten Mauszellen, wie auch in embryonalen Karzinomzellen (Miyachi, Kanekura et al. 1990). Das CD147 Gen ist auf dem Chromosom 19p13.3 lokalisiert und kodiert für ein 29.000 Dalton großes Molekül. Dabei unterscheidet sich die Struktur des Moleküls, beispielsweise variiert das Gewicht der stark glykosylierten Major-Komponente zwischen 35.000 und 65.000 Dalton, abhängig vom untersuchten Organ. Das Protein besteht aus einer extrazellulären Domäne von 187, einer transmembranösen Domäne von 24 und einem zytoplasmatischen Anteil von 40 Aminosäureresten. Insgesamt konnten drei Glykosylierungsstellen innerhalb der Ig-ähnlichen Domäne identifiziert werden, zwei innerhalb der Membran proximal der Ig-Domäne und eine distal von dieser (Iacono, Brown et al. 2007). Die Heterogenität des Proteins geht neben der Glykosylierung auch von der Konfiguration der N-terminale Sequenz aus. Es besteht eine starke Ähnlichkeit zu beiden variablen Ig-Domäne (V) und der MHC-Klasse II β -Kette (Kanekura, Miyachi et al. 1991).

2.11.2 Physiologische Funktionen

Die Entdeckung von CD147 erfolgte 1982 durch Biswang bei einer Untersuchung von Kollagenasen in Kulturen von menschlichen Tumorzellen und Fibroblasten (Biswas, Zhang et al. 1995). Nach der Identifizierung des Glykoproteins und seiner Fähigkeit die Expression von MMP-1 (Kollagenase), -2 (Gelatinase A), -3 (Stromelysin), -9 (Gelatinase B) und -11 zu induzieren wurde es von TCSF (human tumor cell derived collagenase stimulation factor) in EMMPRIN umbenannt. Es zeigte sich, dass membrangebundenes und lösliches CD147 gleichartig zur Induktion der MMP-Produktion durch Fibroblasten in der Lage sind. Die lösliche Form von CD147 konnte als Volllängenprotein in konditioniertem Medium nachgewiesen werden oder als Teil ausgestoßener Mikrovesikel. Weiter konnten Formen mit fehlender transmembranöser und zytoplasmatischer Domäne nachgewiesen werden, die durch eine MMP vermittelte Spaltung von CD147 an der Zelloberfläche stammen. Die Glykosylierung von CD147 wird zur Induktion der MMP-Expression benötigt und stellt so ein potenzielles therapeutisches Ziel dar (Nabeshima, Iwasaki et al. 2006, Iacono, Brown et al. 2007).

Während der Reifung der Thymozyten unterlaufen die Lymphozyten eine Reihe von Kontrollmechanismen zur Transition von unreifen Thymozyten (CD4⁺CD8⁻) zu doppelt Positiven, dabei spielen zwei Signale eine besondere Rolle: der prä-TCR-Komplex (TCR β -Kette, pT α , CD3-Komplex) und möglicherweise auch CD147. Dieser Verdacht erhärtet sich durch die höchste Expression von CD147 in späten Stadien der Lymphozyten-Entwicklung und das Einsetzen eines Entwicklungsstopps nach Zugabe von Anti-CD147. CD147 wird auf APC und T-Zellen exprimiert, was eine allgemeine Funktion von EMMPRIN als Mediator der Zell-Zell-Interaktion und regulatorischen Antigenrepräsentation suggeriert. Eine Blockade der CD147 Expression auf antigenrepräsentierenden Zellen inhibiert die T-Zell-Aktivität (Iacono, Brown et al. 2007).

In der Untersuchung der physiologischen Funktionen von CD147 zeigten sich Beziehungen zu verschiedenen Proteinen, die auf vielen Zelltypen exprimiert werden. Als Mitglied der IgSF spielt es eine kritische Rolle bei der interzellulären Erkennung von Zellen, beispielsweise in lymphoiden und neurogenen Zellen. Durch eine Expression in embryonischen Zellen und Interaktion in verschiedenen Signalwegen ist es in kritische Schritte der Embryogenese involviert. Die breite Verteilung von Basigin über die embryonalen wie adulten untersuchten Zellen von Maus und Mensch unterstreichen die Bedeutung des Moleküls (Miyachi, Kanekura

et al. 1990). So ist die Expression von CD147 durch den Embryo und den Uterus nötig, um eine erfolgreiche Nidation zu garantieren und eine Deletion letal (Igakura, Kadomatsu et al. 1998).

Die physiologische Gewebereparatur und pathologische Remodeling-Prozesse fußen auf einer empfindlichen Balance zwischen MMP-induziertem stromalem Erhalt der Homöostase und Destruktion. CD147 greift in dieses System ein und vermittelt über einen Feedback-Mechanismus zwischen stimulierter Zelle und den benachbarten Fibroblasten. In Ulzera der Kornea wurden deutlich höhere Level von CD147 als in gesundem Normalgewebe nachgewiesen, dazu eine erhöhte MMP-Expression. Im kardiovaskulären System ist die MMP-Expression kritisch zur Prävention von Hypertonie und gleichzeitig fördert sie die Progression der dilatativen Kardiomyopathie. Eine stark verminderte CD147 und MMP-Expression konnten in Arterien von Diabetikern nachgewiesen werden, dies impliziert eine CD147 Deregulation mit Remodeling und damit einhergehender erhöhter Kollagen-Einlagerung in die Gefäßwände. Myokardinfarkte, die durch die Ruptur eines Aortenplaques ausgelöst werden, können die Folge eines MMP vermittelten Prozesses sein, was durch den Nachweis innerhalb vulnerabler Plaques untersucht wurde. Alzheimer, eine neurodegenerative Erkrankung, die durch eine fehlgeleitete Produktion von Amyloid β Peptiden gekennzeichnet ist, könnte unter anderem durch die Assoziation von $\alpha 6\beta 1$ Integrin mit CD147 entstehen. Dieses Integrin bindet an Amyloid β Peptide und eine initiiert eine Signaltransduktionskaskade in Mikrogliazellen (Iacono, Brown et al. 2007).

MCT1 und MCT4 sind Mitglieder der Monocarboxylase-Transporter-Familie und bedürfen der Chaperon-Funktion von CD147 vor ihrer Expression auf der Plasmamembran. Ihre Funktion liegt in der Katalyse Protonen-abhängiger Transporte von Monocarboxylaten wie Lactat und Pyruvat, so tragen sie zur Erhaltung der metabolischen Homöostase der meisten Zellen bei. Eine Hochregulation von CD147 wird von Tumorzellen genutzt, um verstärkt MCT in die Zellmembran einzubauen und das als Abfallprodukt der Glykolyse anfallende Laktat in das häufig hypoxischen TME abzutransportieren, wo es unter anderem T-Zell-Proliferation einschränkt. Eine erhöhte Expression von MCT könnte als Indikator für die Transition von gesunden Zelle zur Malignität dienen (Iacono, Brown et al. 2007).

Integrine stellen eine Superfamilie von Membranproteinen da, die es Zellen individuell ermöglichen untereinander und mit ihrer Umgebung, der extrazellulären Matrix, zu kommunizieren. Die bestehende Assoziation von CD147 zu dieser Gruppe könnte in einer Regulation von Integrin und Laminin mit Einfluss auf verschiedene Prozesse der Basalmembran, der fetalen Entwicklung, Zelladhäsion, Angiogenese und MMP-Induktion

münden. In Zellkulturen von Drosophila-Fliegen zeigte sich, dass die CD147/Integrin-Interaktion essenziell für die Pseudopodien Bildung ist. Innerhalb der Netzhautzellen führt eine Störung der CD147-Integrin-Wechselwirkung zu einer anormale Verteilung von Organellen, einschließlich Mitochondrien, Zellkernen und rauem Endoplasma (Iacono, Brown et al. 2007).

2.11.3 Rolle in der Karzinogenese

Die Herstellung von löslichem EMMPRIN resultiert aus der EMMPRIN-abhängigen und durch MMP proteolytisch vermittelten Interaktion von Tumorfibroblasten mit membranständigem EMMPRIN. Hieraus ergibt sich der Verdacht auf einen positiven Feedback Kreislauf im Tumor. Die Proteindomäne besteht aus einem extrazellulären Anteil aus 2 Immunglobulin ähnlichen Domänen, einer transmembranösen und einem kurzen zytoplasmatischen Anteil. Tumorzell-assoziiertes EMMPRIN beeinflusst die MMP-Stimulation von Fibroblasten durch nahen Zell-Zell-Kontakt. Tumorzellen ohne physikalischen Kontakt zu Fibroblasten vermitteln diesen EMMPRIN-abhängigen Effekt durch eine erhöhte MMP-2 Expression und Aktivierung oder einer erhöhten Migration und Invasion. Das lösliche EMMPRIN könnte sich abseits der Tumordinvasionsfront ausbreiten und so entferntes Stromagewebe stimulieren. Der extrazelluläre Teil des löslichen Moleküls kann bereits die MMP Expression und Endothelzellen stimulieren. Eine erhöhte MMP-Aktivität des Stroma fördert eine Tumordinvasion und Angiogenese. Untersucht wurden diese Effekte in Kulturen von Brustkrebszellen (Tang, Kesavan et al. 2004).

Das Potenzial zur Metastasierung tumoröser Zellen ist abhängig von ihrer Fähigkeit sich den Umgebungsreizen des umliegenden Gewebes zu entziehen, die das Zellwachstum regulieren und beschränken. Dazu werden Veränderungen der Architektur des Zytoskeletts und der Expression von Oberflächenadhäsionsmolekülen benötigt, ebenso eine Penetration der Basalmembran. Die Induktion der MMP-Aktivität vermittelt eine Degradation der EZM, so dass in vivo die Zellbewegung gegenüber den physiologischen Beschränkungen erleichtert wird. Die CD147 Überexpression in einer Vielzahl von Tumorarten, verbunden mit der Eigenschaft MMP zu induzieren suggeriert, dass es eine Schlüsselrolle in verschiedenen Signalwegen der Karzinogenese spielt (Li, Huang et al. 2001, Iacono, Brown et al. 2007).

Ebenfalls zur Wirkung von Basigin im Tumormikromilieu von Brustkrebszellen führten Xu und Kollegen eine Untersuchung der Fibroblasten und Tumorzellen durch (Xu, Lu et al. 2013). Dabei zeigte sich eine Überexpression von EMMPRIN in Brustkrebszellen, die direkt über das Tumorstroma oder parakrine Mechanismen zu einer Transformation von Fibroblasten zu Tumor-assoziierten Fibroblasten (CAF) führt. CAF sind der häufigste Typ von Stromazellen

des TME und können durch die α -SMA-Expression phänotypisch charakterisiert und von normalen Fibroblasten unterschieden werden. Diese Interaktion zwischen Stroma und Tumor wird durch EMMPRIN reguliert und mündet in einer Induktion der EMT mit konsekutivem Risiko von Invasion und Metastasierung durch die CAF. Die von Fibroblasten nach Stimulation durch EMMPRIN sekretierten MMPs spielen kumulativ eine kritischere Rolle in der Tumorzellinvasion, als jene die von den Tumorzellen sekretiert werden (Xu, Xu et al. 2007). In einer Ko-Kultur von Brustkrebszellen mit normalen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CD147 die Expression von α -SMA erhöht und ein Knockdown von CD147 es umgekehrt senkt (Xu, Xu et al. 2007).

Kanekura und Kollegen untersuchten am Maus-Modell den Einfluss von CD147 in pulmonale Metastasen eines malignen Melanoms (Kanekura, Miyauchi et al. 1991). Ähnlich zu anderen Tumoren zeigte sich eine erhöhte CD147 Expression. Der Einfluss auf die Tumordinvasion, Metastasierung, Zellproliferation, VEGF-Produktion, Tumorzell-Glykolyse und Chemoresistenz (MDR) bestärkt die Rolle von Basigin in der Tumorphyse. Zusätzlich könnte es eine Chaperon-artige Funktion in der Faltung, Migration und Expression von Proteinen an der Zelloberfläche ausüben. Eine Assoziation zu den durch CD147 induzierten Oberflächenproteinen MCT, P-gp und CyPA gilt es zum besseren Verständnis der komplexen Funktionen weiter zu untersuchen.

2.11.4 Einfluss auf das Tumormikromilieu

Untersuchungen der EMMPRIN vermittelten Kommunikation zwischen Tumorgewebe und dem umgebenden Bindegewebe an kultivierten Brustkrebszellen zeigten eine positive Rückkopplung der Genexpression während der Tumor-Fibroblasten Zell-Zell-Interaktion. Zusätzlich zur Stimulation der EMMPRIN und MMP Expression vermittelt Tumorzell-assoziiertes EMMPRIN die Freisetzung von löslichem aus membranständigem EMMPRIN durch proteolytische Spaltung während der Tumor-Fibroblasten Interaktion (Tang, Kesavan et al. 2004).

EMPRIN konnte als S100A8/A9-bindendes Protein identifiziert werden, so werden diese S100-Proteine bei chronisch inflammatorischen Hauterkrankungen deutlich hochreguliert. Sowohl in proliferierenden als auch differenzierten Zellen konnte EMMPRIN als S100A9 Induktor nachgewiesen werden. In Untersuchungen an HEK293 Zellen (embryonale menschliche Nierenzellen) konnte eine Expression von S100A8 und S100A9 nachgewiesen werden (Hibino, Sakaguchi et al. 2013). S100A9 aber nicht S100A8 wurde in der Immunpräzipitation nachgewiesen, was andeutet, dass EMMPRIN an S100A9 bindet. Die

S100A9-EMMPRIN-Interaktion ist wichtig in der Induktion proinflammatorischer Faktoren und MMPs in Keratinozyten und Melanozyten. Neben der Immunpräzipitation wurde auch eine spektrometrische Analyse durchgeführt und die Dosis-abhängige Bindung von S100A9 zu immobilisiertem EMMPRIN untersucht. Bei Melanomen war eine frühe Invasion mit einer de novo Expression von MMP-9 und EMMPRIN verbunden. S100A9 aus peripheren Keratinozyten fördert die MMP Produktion in umliegenden Krebszellen durch eine Signaltransduktion über EMMPRIN. MMP ist nun wiederum zur Degradation der Basalmembran und der umgebenden Matrixproteine nötig, was die Grundlage der Metastasierung darstellt. In einigen Tumoren, wie auch dem malignen Melanom, beeinflussen Tumorzellen entfernte Gewebe durch die Etablierung einer prämetastatischen Nische. Die Sekretion proinflammatorischer Faktoren wie VEGF-A, TGF- β und TNF- α durch Tumorzellen induziert selektiv die Expression von S100A8/A9, was die Bildung einer solchen Nische begünstigt (Hibino, Sakaguchi et al. 2013).

Eine erhöhte Expression von CD147 führt zu einer Induktion der MMP Produktion in peritumoralen Fibroblasten, hieraus resultiert eine Degradation der EZM und ein zur Metastasierung begünstigendes TME. Durch das Wachstum eines Tumors entstehen zunehmend hypoxische Bedingungen im TME, die eine Induktion von HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor) bewirken, was einen Transkriptionsfaktor für die MCT-4-Expression in Zellen darstellt. Die Hochregulation von MCT in Tumorzellen ist vorteilhaft für das Überleben des Tumors. Schnelles Tumorwachstum unter hypoxischen Bedingungen wird durch anaerobe Glykolyse ermöglicht, wodurch Laktat anfällt, das durch MCT abtransportiert werden muss. Das so erhöhte Laktat im TME inhibiert die peritumorale T-Zell-Funktion, wodurch ein unkontrolliertes Tumorwachstum ermöglicht wird. Durch die Kopplung der MCT Expression mit CD147 werden beide Proteine zur Expression auf der Zelloberfläche benötigt und eine starke Hochregulation von CD147 wird bei aggressiven Tumoren beobachtet (Iacono, Brown et al. 2007).

In einer systemischen Auswertung und Metaanalyse von Xin und Kollegen wurde die Korrelation von CD147 zu unterschiedlichen Verläufen von Patienten untersucht (Xin, Zeng et al. 2016). Eine Interpretation der Daten sollte unter Kenntnis der Limitierungen durch verschiedene Patientenkollektive (pädiatrische und ältere Patienten), verschiedener Scoring-Kriterien und unterschiedlichen Nachbeobachtungszeiträumen erfolgen. Der kombinierte Nachweis von CD147 und anderen Faktoren wie VEGF und MMP-2 kann hiernach Aussagen über die Prognose mancher Tumore ermöglichen. Kontrovers ist die prädiktive Rolle von

EMMPRIN im Cervixkarzinom und dem HCC, bei Endometrium-Ca, pankreatobiliären Adenokarzinom und einige andere Tumoren ohne eindeutige Signifikanz. Es konnte gezeigt werden, dass CD147 gemeinsam mit anderen assoziierten Proteinen (u.a. MMP-2, MMP-9, MCT-1, MCT-4, Caveolin-1, Ki-67, VEGF, HIF1- α , Cyclophilin A) in der Regulation der Tumorzellinvasion, Metastasierung, Angiogenese, Anti-Apoptose und Adhäsion beteiligt ist. In der Auswertung konnte ein prädiktiver Wert von CD147 auf die Chemo- und Radioresistenz validiert werden. Eine auf EMMPRIN abzielende Target-Therapie könnte die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika erhöhen und zu einer effektiveren Inhibierung von Tumorproliferation und Rezidiven führen. Die hohe Expression von CD147 könnte für viele Tumore ein prognostischer Marker sein, dazu hat es durch verschiedene Interaktionen eine komplexe Rolle in der Tumorprogression (Xin, Zeng et al. 2016).

2.12 Fragestellung

Für das Peniskarzinom existieren aktuell keine Empfehlungen für biochemische Marker in der diagnostischen Routine. Während sich die operativen Behandlungsverfahren über die letzten Jahrzehnte hinsichtlich Invasivität und funktionellem wie ästhetischem Ergebnis verbessern konnten zeigen Patienten mit Lymphknotenmetastasen weiterhin eine schlechte Prognose. Auf Grund der Seltenheit der Erkrankung in vielen westlichen Ländern fehlt von Behandlerseite oftmals die Erfahrung, während in Entwicklungs- und Schwellenländern mit der höchsten Evidenz die medizinische Versorgung, insbesondere für teure Diagnostik, nicht ausreichend ausgebaut ist. Vorausgegangen sind Projekte der Arbeitsgruppe zu S100 und dem Tumormikromilieu weiterer HPV-assoziiierter Krankheitsentitäten wie der Epidermodysplasia verruciformis und dem Cervixkarzinom. Auf dieser Grundlage fußend erfolgte die Untersuchung verschiedener Biomarker an fixierten Gewebeproben sowie an einem in vitro Model des Peniskarzinoms.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Biomarkerprofils (HPV⁺-S100A8⁺/A9⁺-CD15⁺-CD147⁺) für das Peniskarzinom und dazu gehörige Immuninfiltrate. Die entsprechenden Marker wurden hierbei ausgewertet und anschließend in Bezug auf HPV-Status, histopathologischen Subtyp, Differenzierungsgrad, Invasivität, Lymphknotenmetastasierung für eine Risikobewertung untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Ethikantrag, Kohorte und Studiendesign, Materialidentifizierung

Die Ethikkommission des Saarlandes (Ärzttekammer des Saarlandes, Saarbrücken) genehmigte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (WMA) die Verwendung von humanen Materialproben (Ethikvotum 220/19). Die Studienteilnehmer wurden bei neuer Teilnahme und sofern notwendig auch retrospektiv über die Teilnahme informiert und nach der Einwilligung anonymisiert.

Die TMA-Kohorte setzt sich aus Patienten aus Deutschland und Russland zusammen, denen zwischen 1992 und 2015 Proben aus dem Tumorgewebe, angrenzenden Normalgewebe und Lymphknotenmetastasen entnommen wurden. Aus diesen Gewebeproben wurden für die TMAs jeweils 2 Zylinder (\varnothing 2 mm) aus repräsentativen Arealen der Invasionsfront (IF) und 3 Zylinder (\varnothing 0.6 mm) aus repräsentativen Arealen des Tumorzentrums (TZ), der Lymphknotenmetastasen (LKM) und des Normalgewebes der Vorhaut (NO) gewonnen sowie reguläre Gewebsschnitte zur Übersicht. Die Schnittpräparate aller Patienten wurden durch zwei erfahrene Uropathologen befundet. Der histologische Subtyp, wie auch das Grading der Tumore wurden nach der WHO-Klassifikation von 2016 und der 8. Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumore bestimmt (Hölters, Khalmurzaev et al. 2019). Insgesamt wurden Proben von 92 Patienten aus dem Tumorgewebe (IF, TZ, LKM) und Normalgewebe (NO) untersucht und 74 Patienten in die Auswertung miteingeschlossen. Dazu wurden für CD147 auch Proben aus dem angrenzenden Normalgewebe (NO) hinzugezogen und evaluiert. In retrospektiver Betrachtung wurden die Gewebeproben mittels IHC-Färbung für die einzelnen Proteine angefärbt, das Ergebnis lichtmikroskopisch dokumentiert, nach Remmele und Stegner „immune reactive scores“ (IRS) definiert und diese mit den vorhandenen Patientendaten korreliert.

Untersuchungen zu den verwendeten TMAs und sowie die Patientendaten einschließlich der Methodik zur genauen HPV-Status Bestimmung wurden bereits früher publiziert (Hölters, Khalmurzaev et al. 2019, Bernhard, Zwick et al. 2020, Mohr, Zwick et al. 2022). Die DNA wurde aus den FFPE-Schnitten mittels QIAamp-FFPE-Tissue-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Herstelleranweisungen extrahiert. Eine PCR zum Nachweis von HPV-DNA erfolgte ebenso bereits vorab mit dem LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics GmbH) und GP5+/6+ Primern. Durch Benjamin Roth, in der Position eines medizinisch-technischen Assistenten im diagnostischen Labor des Instituts für Virologie des Universitätsklinikum des Saarlandes, erfolgte nach DNA-Amplifikation die in situ Hybridisierung für die HPV-

Genotypisierung. Zusätzlich wurde der HPV-Status durch den immunhistochemischen Nachweis des Surrogatmarkers p16^{INK4a} mit dem monoklonalen Antikörper gegen p16^{INK4a} (Abcam, clone 1D7D2A1) definiert (Hölters, Khalmurzaev et al. 2019, Bernhard, Zwick et al. 2020).

3.2 Immunhistochemie und Auswertung der Färbung

Das Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Gewebe (FFPE), in Form von Tissue-Micro-Arrays (TMA), und Schnitte verschiedener PeCa Tumorregionen und Normalgewebe wurden immunhistochemisch gefärbt. Die Objektträger wurden bei 95°C für 10 Minuten in 1mM Citrat-Puffer (pH 6,0) zur Antigen-Demaskierung erwärmt. Die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität für die 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung wurde mit 3% H₂O₂/ Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) über 10 Minuten durchgeführt. Über Nacht wurden die TMAs und Gewebsschnitte mit S100A8- (#NBP1-42076, rabbit anti-human S100A8, RRID: AB_2184111, Novus Biologicals, Cambridge, UK), S100A9- (#sc-20173, rabbit-anti-human S100A9, RRID: AB_2184420, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) oder CD147/EMMPRIN (BioLegend, Cat# 306202, RRID: AB_314586)-spezifischen Antikörpern inkubiert. Hierauf folgte die Inkubation und Färbung mit Alkalischer Phosphatase(AP)- und Meerrettichperoxidase(HRP)-konjugierten Anti-rabbit/mouse Antikörpern mit anschließender Zugabe von DAB- oder AP/HRP-Substraten (ImmPRESS® HRP/Peroxidase Reagent Kit und VECTOR® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit [Alkaline Phosphatase Anti-Rabbit/Mouse IgG], beide Vektoren, Burlingame, CA, USA). Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Lösung (Gill's Formula) wurden die Schnitte mit VectaMount® versiegelt und beschriftet. Die zur Auswertung des Immuninfiltrat genutzte CD15-Färbung (mouse anti-human CD15 (1:500, Dako, Glostrup, Dänemark)) wurde bereits vorab von (Bernhard, Zwick et al. 2020) durchgeführt und in einer unabhängigen Auswertung in Co-Autorenschaft publiziert.

Die Aufnahmen der Färbung wurden mit einem Leica® DMI6000 (RRID: SCR_018713) und der LAS X Software (RRID: SCR_013673) aufgenommen. Übersichtsaufnahmen der TMAs wurden mit dem Olympus® VS120 Slide Scanner angefertigt

Anhand der Übersichtsaufnahmen durch den Slide Scanner erfolgte die Zuordnung der einzelnen TMAs über ein von mir erstelltes Raster und ihrer Position darin zu den dazugehörigen Patienten. Abgeschwommene, artifiziell beschädigte und zerstörte TMAs wurden aus der Evaluation ausgeschlossen. Die Färbung wurde mit der semiquantitativen Methode des IRS nach Remmele und Stegner bewertet. Dieser setzt sich zum einen aus der Färbintensität (staining intensity=SI) zusammen und vergibt 0 Punkte für keine nachweisbare

Färbung, 1 Punkt für eine geringe, 2 Punkte für eine mäßige und 3 Punkte für eine starke Färbeintensität. Zum anderen wird die Anzahl positiv nachweisbarer Zellen (PP) ausgewertet, sind keine positiven Zellen nachweisbar werden 0 Punkte, bei weniger als 10% positiven Zellen 1 Punkt, bei 10-50% positiven Zellen 2 Punkte, bei 51-80% positiven Zellen 3 Punkte und bei mehr als 80% positiven Zellen 4 Punkte vergeben. Aus beiden Zahlen wird ein Produkt gebildet, liegt der errechnete Score zwischen 0 und 2 gilt die Färbung als negativ, liegt er zwischen 3 und 12 wird die Färbung als positiv bewertet.

3.3 Zelllinien und Kulturbedingungen

Aus Primärkarzinomen und Lymphknotenmetastasen wurden drei HPV-positive PeCa-Zelllinien generiert, darunter auch eine aus einem Primarius-abgeleitete (P2) Zelllinie mit der korrespondierenden Lymphknotenmetastasen (L2)-Zelllinie, sowie eine weitere aus Metastasen stammende Zelllinie eines anderen Patienten (L3). Die Multiplexion GmbH authentifizierte 2018 die gewonnenen Tumorzellen unter Verwendung der ursprünglichen Biopsate von Patienten, die sich einer Penektomie sowie einer metachronen radikalen inguinalen Lymphadenektomie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein unterzogen. Eine weitere Authentifizierung erfolgte 2022 ebenfalls durch die Multiplexion GmbH im Auftrag des Instituts für Virologie am Universitätsklinikum des Saarlandes, hiermit wurde eine Rückauthentifikation zu den originären Biopsien gewährleistet. Die Proben entsprechen einem Plattenepithelkarzinom des Penis. Die Etablierung der Zellkulturlinien sowie die durchgeführten Analysen mit immunhistochemischen Färbungen, PCR-Testung und verschiedenen Assays zum Screening von Zytokinen wurde bereits ausführlich publiziert (Naumann, Sperveslage et al. 2012). Der HPV-Status der Zelllinien wurde nachträglich bestimmt und in der Methodik bereits ebenfalls publiziert (Bernhard, Zwick et al. 2020).

Die Zellen wurden in PeCa-Medium (1:1-Mischung aus Keratinozyten Wachstumsmedium 2 (KGM2) mit Supplementen [C- 20011, 0,004 ml/ml Rinder-Hypophysen-Extrakt, 0,125 ng/ml Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), 5 µg/ml Insulin, 0,33 µg/ml Hydrocortison, 0,39 µg/ml Epinephrin, 10 µg/ml Transferrin, 0,06 M Calciumchlorid; PromoCell, Heidelberg, Deutschland] und RPMI 1640 mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum (FCS), 1 % Natrium Pyruvat und 1 % Penicillin und Streptomycin (R10+/, Merck, Schnellendorf, Deutschland)) kultiviert. Normale Vorhaut-Keratinozyten (NFK) und menschliche Vorhautfibroblasten (HFFC) wurden aus Vorhautgewebe am Universitätsklinikum des Saarlandes isoliert und in der PCR-Testung als HPV negativ bestätigt. Die Zellen wurden in KGM2 (C- 20011, PromoCell) und Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 %

hitzeinaktiviertem FCS, 1 % Natriumpyruvat, bzw. 1 % Penicillin und Streptomycin (D10+/+) kultiviert. Die NFKs wurden für Experimente in PeCa-Medium kultiviert. Einmal monatlich erfolgte die routinemäßige Durchführung einer Mykoplasmen-spezifische PCR zum Ausschluss potenzieller Kontaminationen. Alle Zelllinien wurden unterhalb einer Passageanzahl (Anzahl an Subkulturen aus den Zelllinien) von 20 genutzt, NFKs bis zu 4 und HFFC bis zu 7 genutzt. Organotypische dreidimensionale (3D) Kulturen wurden mit HFFC (5×10^5 Zellen, Passagen 3–5), eingebettet in 1 ml Rattenkollagen [wie zuvor beschrieben (Bernhard, Zwick et al. 2020)] in einer 24-Well-Platten mit D10+/+-Medium erzeugt. Am Folgetag wurde eine Stunde vor dem Aussähen von 7×10^5 PeCa-Zellen auf die Kollagen-Fibroblasten-Matrix das PeCa-Medium getauscht. Nach einem weiteren Tag wurden die Kulturen auf ein Metallgitter in einer 6-Well-Platte ausgesät, um ein mehrschichtiges Wachstum am Luft-Flüssigkeits-Übergang zu ermöglichen. Vierzehn Tage später wurden die Überstände abpipettiert, die organotypischen 3D-Kulturen in 4 % Paraformaldehyd (Merck) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Methodisch wurde dies bereits vorab in der Arbeitsgruppe etabliert und publiziert (Marthaler, Kalejta et al. 2017).

3.4 Datenverarbeitung und statistische Analysen

Graphische Darstellung, lineare Regression und statistische Analysen sind mit Graph Pad Prism® 9.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, RRID: SCR_002798) und Microsoft Excel® (Version 2110 Build 16.0.14527.20234) durchgeführt worden. Die jährliche prozentuale Änderung (APC) ist mit der Formel $APC = (\text{Exp}(\text{slope}) - 1) \times 100$ berechnet. Die Datensätze sind als Gruppen- oder Kontingenztafeln formatiert, Mittelwerte sind mit \pm SD (Standardabweichung)/SEM (Standardfehler) dargestellt. Die Daten werden graphisch in interleaved oder stacked bars, sowie Box- und Whiskers-Blot dargestellt, die die individuellen Ergebnisse mit Minimum und Maximum abbilden. Die Signifikanz wurde durch einfache und zweifache Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholungsdesigns sowie mit Tukey's test und Fisher's exact test wie angegeben bestimmt. Als statistisch signifikant werden p-Werte ≤ 0.05 definiert und nach Graduierung des Signifikanzniveaus mit Sternchen gekennzeichnet.

Die epidemiologischen Daten der Abbildung (Abb. 1A&B) basieren auf der IX. Auflage der „Cancer Incidence in Five Continents“ der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC). Als eine finanziell unabhängige Nichtregierungsorganisation (NGO), die seit 1965 Teil der WHO ist, operiert diese mit wissenschaftlichen Mitarbeitern in mehr als 50 Ländern. Ihre Aufgabe besteht darin epidemiologische Daten zur Inzidenz von Tumorerkrankungen und Informationen zu möglichen Kanzerogenen und ihrem Gefahrenpotential in der Umwelt zu

sammeln. In der Referenzzeit von 1998 bis 2002 wurden die Daten der hier genutzten IX. Auflage erhoben. Darin wurden die Daten aus 60 Ländern, 225 Registern und 300 Bevölkerungsgruppen bezüglich der altersstandardisierten Inzidenzrate (ASR) bei Diagnosestellung evaluiert. So konnten unter anderem regionale Unterschiede zwischen verschiedenen Ethnien und sozioökonomischen Schichten innerhalb der Länder aufgezeigt werden. Aus dieser Gesamtheit wurde hier eine internationale Auswahl verschiedener Länder dargestellt, welche die Unterschiede in der ASR exemplarisch abbilden. Dazu sind die nach der 10. Edition der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD) als C60 kodierte Malignome eingeschlossen und graphisch dargestellt worden.

Die zugrunde liegenden Informationen für Darstellung (Abb. 1C) stammen vom Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) des Robert Koch-Instituts. Darin werden in Deutschland die Daten der Landeskrebsregister auf Bundesebene zusammengeführt, um diese transparent und wissenschaftlich-valide für Forschung und Öffentlichkeit bereit zu stellen. Alle 2 Jahre erscheint die neuste Publikation „Krebs in Deutschland“, in der die Epidemiologie und die aktuellen Trends 27 verschiedener Krebsarten veröffentlicht werden. Die Datenabfrage erfolgte über die Webseite des ZfKD („Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut: Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten (DOI: 10.18444/5.03.01.0005.0014.0001). Mortalitätsdaten bereitgestellt vom Statistischen Bundesamt. www.krebsdaten.de/abfrage, Letzte Aktualisierung: 17.12.2019, Abrufdatum: (17.11.2020)“), hierrüber können jederzeit öffentlich zugängliche Informationen zu Neuerkrankungs-, Sterbe- und Überlebensrate sowie Prävalenz abgerufen werden. Mit der Datenabfrage wurde die Inzidenz als ASR pro 100.000 Einwohner für das Peniskarzinom (ICD10 C60) zwischen 1999 und 2016 in Deutschland abgerufen. Daraus wurde unter Anwendung einer lineare Regressionsanalyse ein möglicher zukünftiger Trend zu ermittelt und als Grafik dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Die Inzidenzrate des Peniskarzinoms steigt

Penile Plattenepithelkarzinome sind die häufigsten urogenitalen Malignome des Mannes. Während in Deutschland und anderen westlichen Industrienationen, exemplarisch am Beispiel des Saarlandes dargestellt (Abb. 1A), die altersstandardisierte Inzidenzrate (ASR) unter 1/100.000 Einwohner liegt zeigt sich wie bereits im Einleitungsteil dargestellt global eine deutliche Varianz zwischen verschiedenen geographischen Regionen. Über die Lebenszeit hinweg zeigt sich die höchste kumulative Fallzahl für Peniskarzinome bei älteren Männern, vor allem in der siebten bis achten Lebensdekade (Abb.1 B). Mit der mit dem Lebensalter steigenden Prävalenz von HR-HPV Infektionen der Schleimhäute, wie beispielsweise der des Penis, der Vulva, der Cervix uteri, dem Anus und den Tonsillen, steigt auch die jährliche Inzidenzrate für HPV-induzierte Karzinome, wie auch für das PeCa. Aktuelle Daten aus dem deutschen Krebsregister unterstreichen diese Hypothese und stimmen mit Daten zu steigender Prävalenz HPV-assoziiierter Tumoren anderer Körperregionen überein, so dass hier ein Anstieg von 1 auf 1,5 Fälle pro 100.000 zwischen 1999 und 2016 zu verzeichnen ist (Abb. 1C). Ab dem Jahr 2017 wurde die ICD-10-Kodierung im Bulletin für das Peniskarzinom im Krebsregister geändert und zum Zeitpunkt der Datenabfrage liegt nur die Auswertung bis zum Jahr 2016 vor. Durch eigenständige Extrapolation der Zunahme der altersstandardisierten Rate (ASR/100.000) aus diesen Daten (Abb. 1C) bis zum Jahre 2030 mittels eines einfachen linearen Regressionsmodells zeigt sich ein Anstieg der ASR auf über 2.0 innerhalb der nächsten 10 Jahre mit einer kalkulierten APC von 3,2% (Abb.1 D).

Durch den jährlichen Anstieg der Fallzahlen des PeCa auch hierzulande steigt auch die Notwendigkeit vielversprechender diagnostischer Marker zur Stratifizierung des individuellen Risikos für aggressive Verläufe mit früher Tumorinvasion und Lymphknotenmetastasierung. Frühere Daten zu S100A8/A9-vermittelter Chemotaxis von Neutrophilen in HPV-assoziierten Hauttumoren und infiltrierenden Neutrophilen in HPV-positiven PeCas (Podgorska 2017, Bernhard, Zwick et al. 2020) implizierten bereits eine Relevanz der Calprotectin-Untereinheiten auch für das PeCa. Konsequenterweise wurde die S100A8 und S100A9 Expression in PeCa und deren Relevanz als potenziellen Biomarker zur Risikostratifizierung und Therapieplanung untersucht.

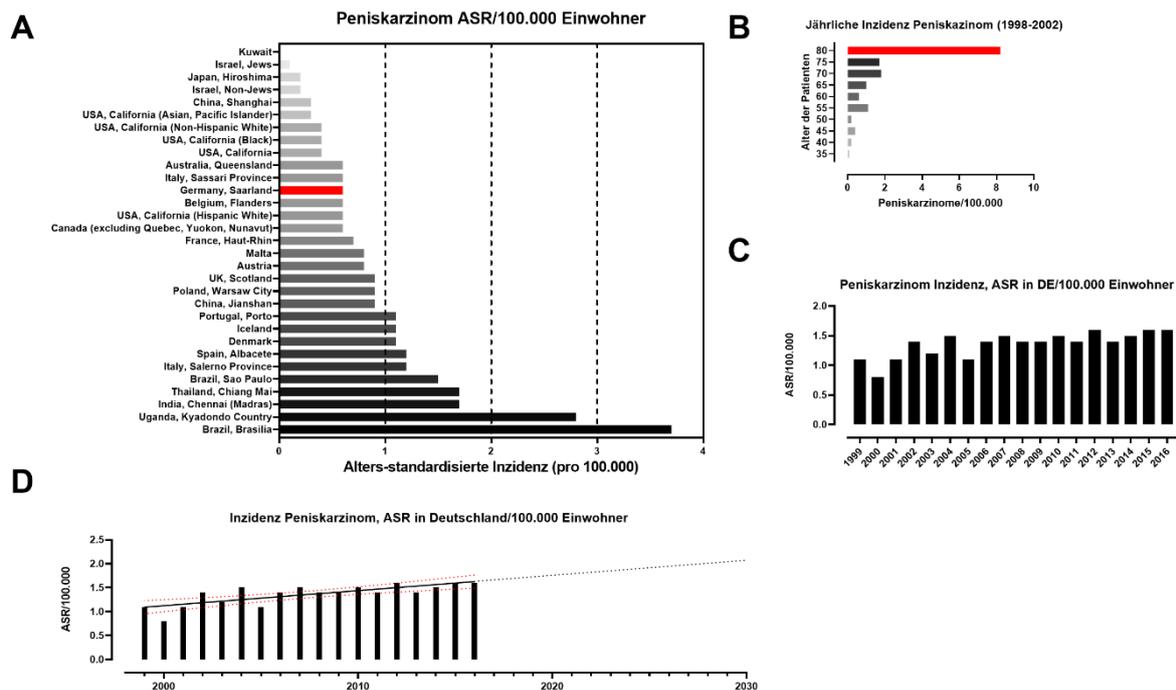


Abbildung 1 Epidemiologie des Peniskarzinoms:

A) Altersstandartisierte Inzidenzrate (ASR) des Peniskarzinoms pro 100.000 Einwohner weltweit, adaptiert von Daten aus Curado et. al Cancer incidence in five continents. Volume IX. IARC Sci Publ. 2008;(160):1-837. PMID: 19388204. B) Nach dem Alter stratifizierte jährliche Inzidenz des Peniskarzinom bei Diagnosestellung, ebenso von Curado und Kollegen adaptiert. C) ASR des Peniskarzinom pro 100.000 Einwohner in Deutschland zwischen 1999 und 2016, basierend auf den Daten des deutschen Krebsregisters des RKI. D) Mit Daten aus C) erfolgte eine Extrapolation mittels linearer Regression zur Simulation der ASR in Deutschland bis 2030.

4.2 Untersuchtes Patientenkollektiv

Von den insgesamt 95 untersuchten Patienten (Tab. 1) wurden vorab jene ausgeschlossen bei denen kein Datum der Diagnosestellung hinterlegt war, der histologische Subtyp undefiniert oder einem CIS entsprach, sowie Patienten mit invalider und nicht durchgeführter PCR für HPV-DNA, da nur ein zuverlässig positives oder negatives Ergebnis zusammen mit dem Nachweis für den Surrogatmarker p16 eine sichere Aussage zum HPV-Status erlaubt. Patienten deren Material, während der Färbeverfahren abschwammen oder durch Beschädigung so artifizuell verändert wurden, dass sie nicht mehr zu befunden waren, wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Das mediane Alter der Patienten lag zwischen 54 und 57 Jahren (95% Konfidenzintervall). Der jüngste eingeschlossene Patient war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 25 Jahre, der älteste war 88 Jahre alt.

Bei 7 Patienten konnte pathologisch kein T-Stadium ermittelt werden. 31 Patienten zeigten ein T1-Stadium, wobei 21 ein pT1a-Stadium und 10 ein pT1b aufwiesen. Die Unterteilung erfolgte anhand des Vorhandenseins einer lymphovaskulären und/oder perineuralen Infiltration und andererseits durch ein hohes Grading (schlecht differenziert, undifferenziert, sarkomatoid). 18 zeigten ein T2-Stadium, in dem eine Infiltration des Corpus spongiosum definierend ist. 17 Patienten zeigten ein T3-Stadium, in dem bereits die Corpora cavernosa penis infiltriert sind und eine Urethra-Invasion vorliegen kann. Bei einem Patienten lag ein T4-Stadium vor, bei dem Nachbarstrukturen wie das Skrotum, das Os pubis oder die Prostata infiltriert sind.

Bei 10 Patienten war der Lymphknoten-Status unbekannt. In 42 weiteren Fällen konnten keine regionären Lymphknotenmetastasen festgestellt werden, wobei der Status bei 17 Fällen klinisch und bei 25 Fällen weiterhin pathologisch erhoben wurde. Bei 7 Patienten lagen ein oder zwei Metastasen in Leistenlymphknoten vor. 4 Patienten zeigten Metastasen in mehr als zwei unilateralen inguinalen oder bilateralen Leistenlymphknoten. 11 Patienten zeigten eine ausgedehnte Lymphknotenmetastasierung mit einer Infiltration der uni- oder bilateralen Beckenlymphknoten, oder einer extranodalen Ausbreitung regionärer Lymphknotenmetastasen.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung konnten bei insgesamt 3 Patienten Fernmetastasen diagnostiziert werden.

11 Patienten wiesen gut differenzierte (G1) Tumore, 41 mäßig differenzierte (G2) und 22 schlecht differenzierte (G3) Tumore auf. 46 Patienten zeigten ein invasives Wachstum, was hier als ein T-Stadium $>pT1a$ ($pT1b$ - $pT4$) definiert wurde. 22 Patienten zeigten eine Metastasierung (Lymphknotenmetastasen), die hier als ein N-Stadium $\geq N1$ ($N1$ - 3) definiert wurde.

Ein positiver HPV-Status wurde als positiver HPV-DNA-Nachweis und dem gleichzeitig immunhistochemischen Nachweis von p16 definiert. Insgesamt zeigen sich 29 Patienten HPV positiv und 45 HPV negativ. Näher betrachtet konnten in 26 Tumoren HPV16 und in drei weiteren jeweils HPV11, HPV18 und HPV59 nachgewiesen werden. In 12 Lymphknotenmetastasen wurde HPV16 nachgewiesen, in einer weiteren HPV18. Von den vorhandenen Fernmetastasen war eine einzige HPV16 positiv. Es lagen somit nur Monoinfektionen vor.

	Gesamtzahl (n)	prozentualer Anteil (%)
Patienten	74	
Alter bei Diagnosestellung		
<50	16	21,6
50-70	37	50,0
>70	21	28,4
Medianes Alter (95% CI)	57,3 - 54,7	
Tumor-Stadium		
pTx	7	9,5
pT1	31	41,9
pT2	18	24,3
pT3	17	23,0
pT4	1	1,4
Lymphknoten-Status		
pNx	10	13,5
c/pN0	42	56,8
pN1	7	9,5
pN2	4	5,4
pN3	11	14,9
Fernmetastasen		
M	3	4,1
Grading		
gut differenziert (G1)	11	14,9
mäßig differenziert (G2)	41	55,4
schlecht differenziert (G3)	22	29,7
Invasives Wachstum		
pT1b-T4	46	62,2
Metastasiertes Wachstum		
pN1-N3	22	29,7
HPV-Status		
HPV+	29	39,2
HPV-	45	60,8

Tabelle 1 Patientenkollektiv und Tumor-Charakteristika:

Gesamtzahl, Altersverteilung und medianes Alter, TNM-Stadium, Grading, invasives/metastasiertes Wachstum und HPV-Status

Die meisten Patienten waren in dem von mir untersuchten Kollektiv zwischen 50 und 70 Jahre alt. Betrachtet man den Zusammenhang von HPV⁺-Tumore mit dem Alter zeigte sich dieser in der Gruppe mit einem Alter bei Diagnosestellung von über 70 Jahren mit 47,6% am stärksten

(>50J 43,8%, 50-70J 32,4%) (Abb. 2A). Bezogen auf das Grading zeigte sich über alle 3 Altersgruppen hinweg, dass Tumore am häufigsten als G2 klassifiziert wurden (<50J 62,5%, 50-70J 54,1%, <70J 52,4%) (Abb. 2A). In der Gruppe, der unter 50-Jährigen kamen als einzige keine G1-Tumore vor und zeigten von allen drei Altersgruppen mit 37,5% die meisten G3-Tumore (50-70J 24,3%, >70J 33,3%) (Abb. 2A).

Auch unabhängig vom Alter zeigten sich G2-Tumore als häufigstes Grading mit 55,4% in der untersuchten Patientengruppe (G1 14,9%, G3 29,7%). Die G1-Tumore waren in diesem Kollektiv alle HPV negativ, während die G3 Tumore überwiegend HPV positiv waren (81,8%). Die G2 Tumore waren häufiger HPV negativ (73,2%) als positiv (26,8%). Im Fisher's exact test zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied von Proben mit positivem HPV-Status zwischen Grading 1 und 3 (****p<0,0001) sowie 2 und 3 (****p<0,0001), damit korrelierte ein geringerer Differenzierungsgrad also mit HPV-Positivität (Abb. 2B).

Invasive Tumore (pT1b-pT4) zeigten meist ein Grading von 2 (45,7%) und 3 (43,5%), während G1-Tumore deutlich seltener waren (10,9%) (Abb. 2C). Tumore von Patienten mit Metastasen (pN1-N3) zeigten sich am häufigsten mit einem Grading von 3 (54,5%) und einem Grading von 2 (45,5%). Keiner von ihnen wies einen G1-Tumor auf (Abb. 2C). Metastasiertes Wachstum war hierbei signifikant häufiger mit einem HPV⁺-Status (68,2%) assoziiert als invasives Wachstum (41,3%) im Fisher's exact test (*p=0,0342) (Abb. 2C)

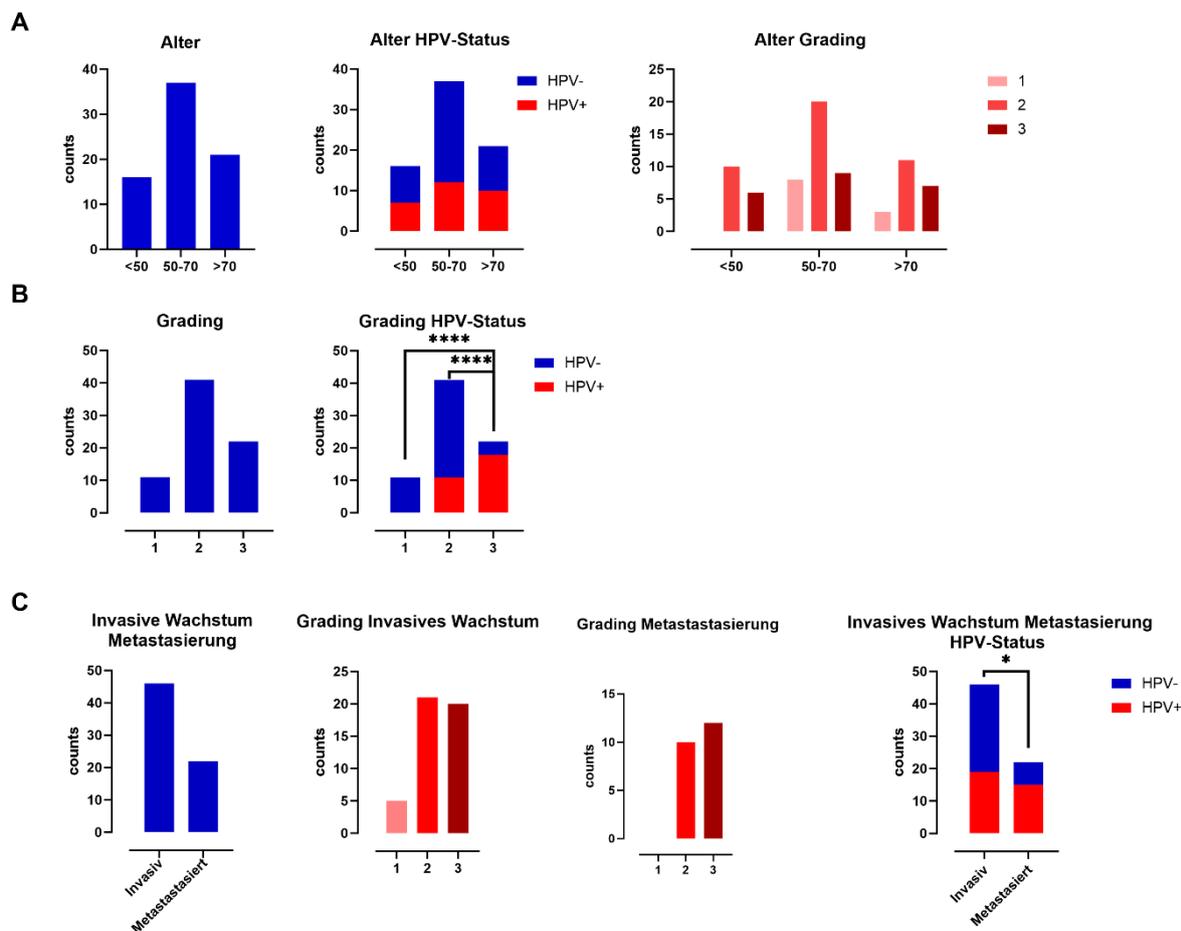


Abbildung 2 Auswertung der Patientenkohorte nach Alter, Grading und HPV-Status:

A) Aufteilung der Patienten (n=74) in den 3 Gruppen nach dem Alter bei Diagnosestellung, sowie zusätzlich dem HPV-Status (positive GP-PCR und p16^{INK4a}-IHC Färbung) und dem Grading (1 = gut differenziert, 2 = mäßig differenziert, 3 = schlecht differenziert). B) Aufteilung der Patienten nach dem Grading, sowie zusätzlich unter Betrachtung des HPV-Status. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Anteil des positiven HPV-Status zwischen Grading 1 und 3 (****<0,0001) sowie 2 und 3 (****<0,0001) im Fisher's exact test C) Betrachtung des invasiven Wachstums (n=46, pT1b-pT4) und der Metastasierung (n=22, pN1-3) innerhalb des untersuchten Kollektivs, sowie der Aufteilung nach dem Grading und dem HPV-Status. Signifikanter Unterschied zwischen HPV^{+/-}-Proben mit invasivem Wachstum und Metastasierung (*0,0387) im Fisher's exact test

Das Peniskarzinom wird in 14 verschiedene histologische Subtypen unterteilt: 1 Plattenepithelkarzinom (gewöhnlicher Typ/SCC), 2 Pseudohyperplastisches Karzinom, 3 Pseudoglanduläre Karzinom, 4 Reines verruköse Karzinom, 5 Carcinoma cuniculatum, 6 Papilläres Karzinom NOS (not other specified), 7 Adenosquamöses Karzinom, 8 sarkomatoides SCC, 9 Mischdifferenziertes Karzinom, 10 Papillär-basaloides Karzinom, 11 warzig-basaloides Karzinom, 12 warziges (kondylomatöses) Karzinom, 13 basaloides Karzinom, 14 Klarzelliges

Karzinom. In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv traten 9 der oben genannten Subtypen auf und wurden in die Auswertung miteingeschlossen (1. 36 Patienten, 2. 5 Patienten, 3. 1 Patient, 4. 5 Patienten, 10. Patient 1, 11. 8 Patienten, 12. Patienten 6, 13. Patienten 11, 14. 1 Patient). Die Heatmaps (Abb. 3) zeigen eine Übersicht der Altersverteilung, des Gradings und des HPV-Status für die einzelnen Subtypen, einmal für die Anzahl der Patienten und zur besseren Veranschaulichung der Relationen innerhalb der Subtypen mit prozentuaalem Anteil.

Die häufigste Altersgruppe über alle Subtypen hinweg war die zwischen 50-70 Jahren, bei einem mittleren Alter von 61 Jahren. Dies zeigte sich sowohl für die HPV-positiven wie auch die negativen Tumore. Ein höheres Alter (>70) war auch hier mit einem häufigeren Auftreten von HPV-assoziierten bzw. HPV-positiven PeCa (11-14) verbunden (Abb. 3A).

Das am häufigsten vorkommende Grading war G2 (mäßig/moderat), sowohl bei HPV-positiven wie negativen Tumoren, während G3 vor allem bei HPV-assoziierten Subtypen und Tumoren mit HPV-positivem Status auftrat. So zeigte sich auch bei den statistisch überwiegend HPV-negativen gewöhnlichen SCC (1), dass bei HPV-positivem Status mehr Tumore eine schlechte Differenzierung (G3) aufwiesen als bei HPV-negativen Tumoren (Abb. 3B).

Am häufigsten zeigte sich ein invasives Wachstum beim gewöhnlichen SCC (1) mit einem Grading von 2 und 3. HPV-positiven Tumoren oder solche Subtypen, die damit assoziiert waren zeigten eine schlechtere Differenzierung (G3), als solche die es nicht waren. Die meisten Metastasen fanden sich beim SCC (1) mit einem Grading von 2 und 3, sowie bei HPV-positiven oder assoziierten Tumoren (Abb. 3C).

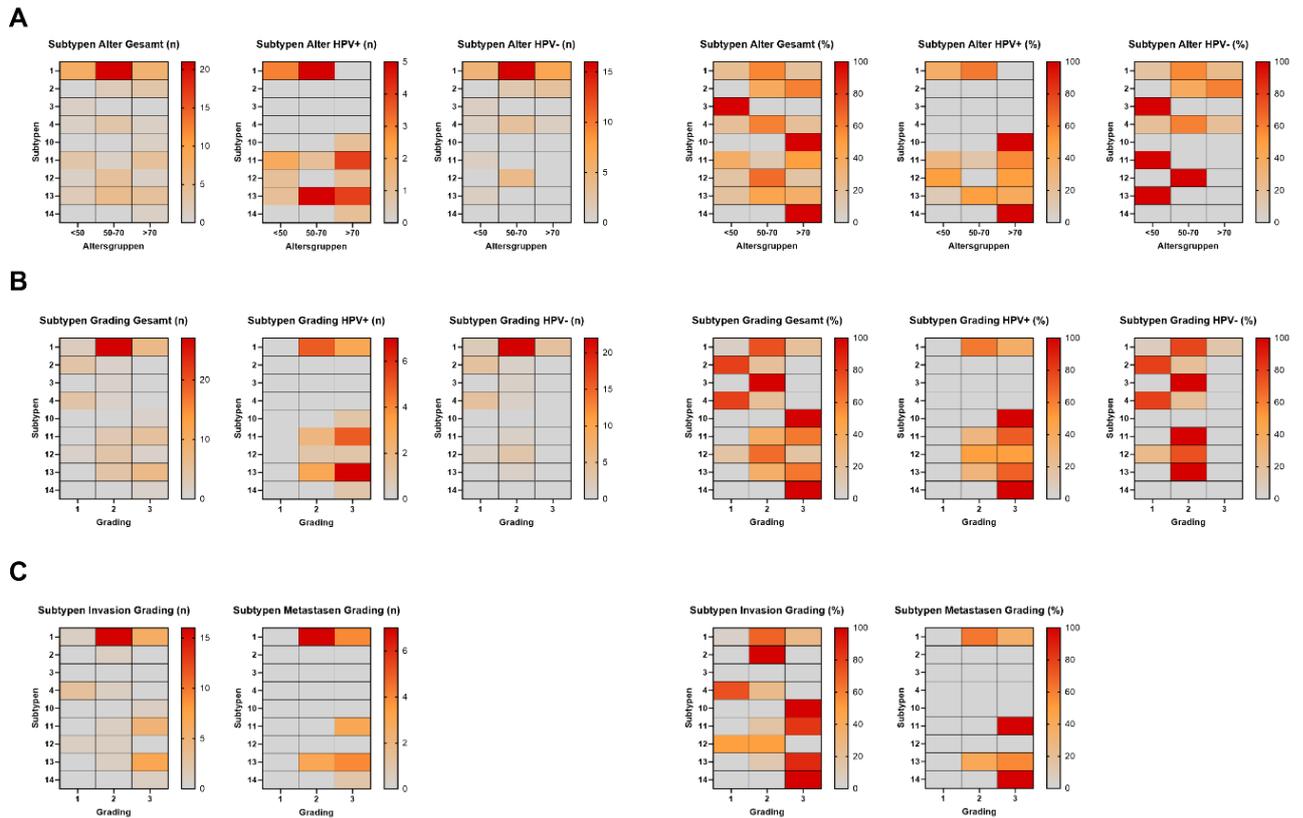


Abbildung 3 Heatmap-Übersicht des Patientenkollektivs eingeteilt nach Subtypen, mit Alter, Grading und HPV-Status in nominaler und prozentualer Darstellung (von links nach rechts):

A) Altersverteilung und Subtypen des Patientenkollektivs unter Betrachtung des HPV-Status: 1. Altersverteilung, 2. HPV-positive Proben, 3. HPV-negative Proben. B) Grading und Subtypen des Patientenkollektivs unter Betrachtung des HPV-Status: 1. Grading, 2. HPV-positive Proben, 3. HPV-negative Proben. C) Grading und Subtypen des Patientenkollektivs unter Betrachtung der Tumorausbreitung: 1. Invasives Wachstum 2. Metastasierung.

4.3 IHC-Färbung von S100A8/A9 und CD147 im Tumorgewebe sowie Immuninfiltrat in TMAs, Gewebeschnitten und Zellkulturen

4.3.1 IRS von S100A8/A9 der TMAs

Bei der Untersuchung der Expression beider Calprotectin-Untereinheiten S100A8 und S100A9 wird hier zwischen Patientenproben des Tumorzentrums (TMA TZ, n = 63), der Invasionsfront (TMA IF, n = 57) und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen (TMA LKM, n = 22) differenziert. Die Schnitte wurden von mir immunhistochemisch gefärbt und diese Färbung anschließend nach dem IRS nach Remmele & Stegner bewertet. Die einzelnen Tumorproben pro Träger wurden mit Hilfe eines Slide-Scanners dann über ein von mir erstelltes Raster den Patientendaten zugeordnet und ausgewertet. Als HPV-positiv wurden Tumore gewertet, bei

denen ein positiver PCR-Nachweis für HPV-DNA und in der IHC für den Surrogate-Marker p16^{INK4a} vorlag.

Die abgebildeten TMAs sind exemplarische Beispiele aus der Invasionsfront (IF), dem Tumorzentrum (TZ) und Lymphknotenmetastasen (LKM) für den etablierten Färbescore für S100A8 (Abb. 4A) und S100A9 (Abb. 4B). Zu erkennen waren verschiedene Intensitäten der Färbung, zum Teil lag diese nur nukleär, zytosolisch oder selten ausschließlich membranös vor, meist jedoch in einer Mischung als eine Färbung der gesamten Zelle. In den Färbungen zeigten sich wiederkehrende Muster von Tumornestern und dem umliegenden Tumormikromilieu, zum einen durch die Tumorzellen selbst, aber auch durch infiltrierende Immunzellen (Abb. 7). Dies ließ sich vergleichend auch in der Zusammenschau mit den Färbungen aus konventionellen Gewebsschnitten von PeCas zeigen (Abb. 5 & Abb. 6)

Die Mehrheit der als TMA untersuchten PeCa-Proben war positiv für S100A8 (Abb. 4C), wie auch für S100A9 (Abb. 4D) bezüglich des Tumorzentrums (S100A8: 92,1%, S100A9: 91,5%), der Invasionsfront (S100A8: 91,2%, S100A9: 65,5%) und vor allem bei den LKM (S100A8: 100,0%, S100A9: 100,0%). Bemerkenswerterweise war die Mehrheit der S100A8⁺S100A9⁻-Proben HPV im Hinblick auf das Tumorzentrum (S100A8⁺HPV: 63,5%, S100A9⁺HPV: 62,7%) und die Invasionsfront (S100A8⁺HPV: 61,4%, S100A9⁺HPV: 61,8%), während es bei den LKM genau umgekehrt war, mit über zwei Drittel und über drei Viertel HPV⁺-Proben (S100A8⁺HPV⁺: 70,0%, S100A9⁺HPV⁺: 80,0%). Ich habe die Anzahl an Proben mit positivem und negativem IRS für S100A8 (Abb. 4E) und S100A9 (Abb. 4F) unter Einbeziehung des HPV-Status zwischen den TMAs verglichen. Dabei zeigte sich zwischen IF und TZ ein signifikanter Unterschied von $p \leq 0.01$ im Fisher's exact test für HPV⁺- (**p=0,0093) und für HPV⁻- (*p=0,0114) PeCa- Proben für die Calprotectin-Untereinheit S100A9, aber nicht für S100A8. Insgesamt zeigte sich eine erhöhte S100A8- und S100A9-Expression insbesondere am Tumorzentrum und an Lymphknotenmetastasen.

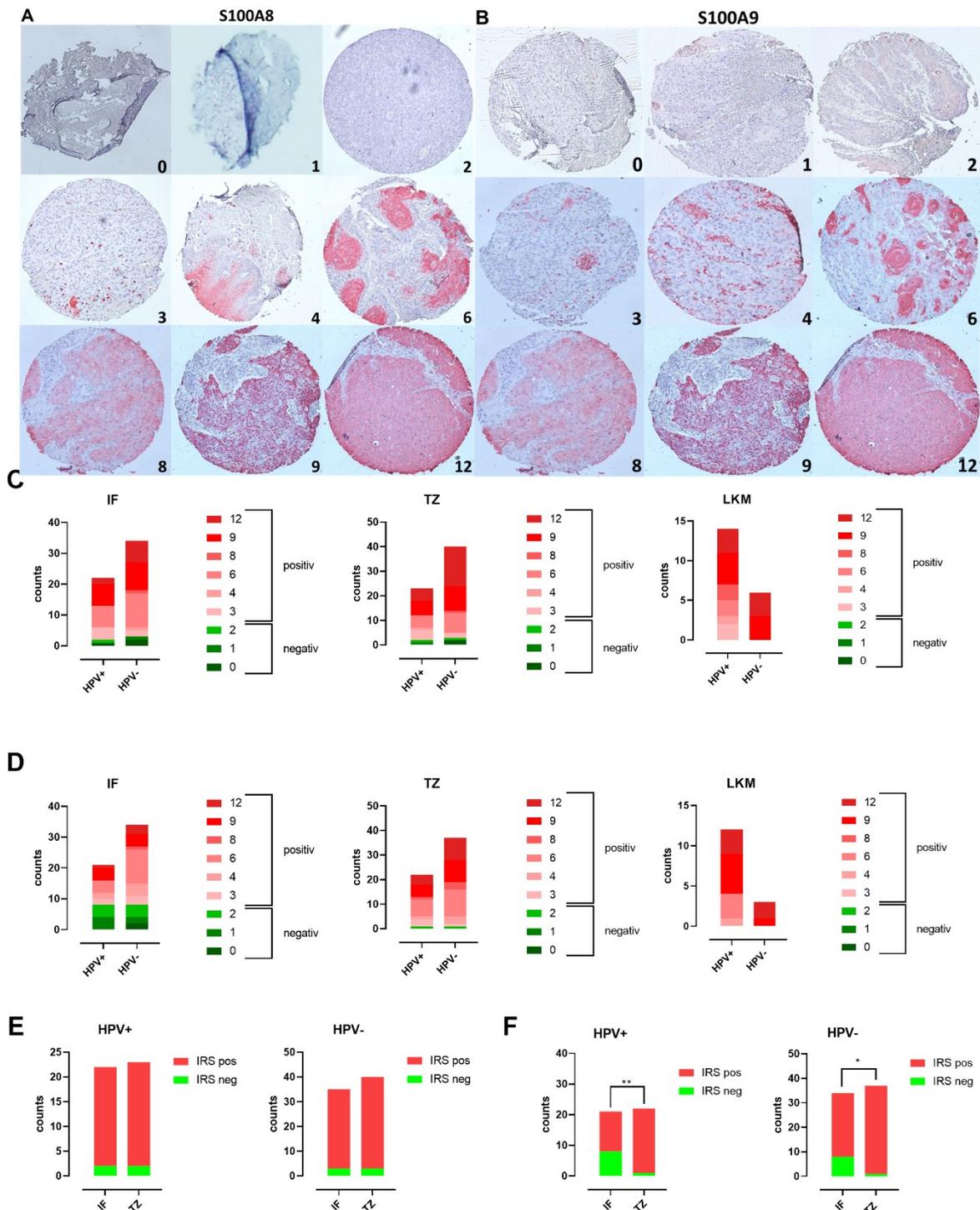


Abbildung 4 IRS der PeCa-Proben für die S100A8/A9-Färbung:

Übersicht der verschiedenen IRS-Grade anhand exemplarischer TMA-Färbungen für S100A8 (A) und S100A9 (B). Nach Remmele und Stegner setzt sich der Score aus der Färbeintensität und der Anzahl gefärbter Zellen pro Probe zusammen. Proben aus IF, TZ und LKM sind anhand ihres IRS und dem HPV-Status für S100A8 (C) und S100A9 (D) dargestellt. Anzahl an Proben mit positivem und negativem IRS für S100A8 (E) und S100A9 (F) wurden verglichen zwischen IF und TZ, sowie dem

HPV-Status. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied von für HPV⁺ (**0,0093) und HPV⁻ (*0,0114) im Fisher's exact test.

4.3.2 Färbemuster von S100A8/A9 in Gewebegeschnitten

Die Färbung für die beiden S100-Untereinheiten beschränkte sich bei den Gewebsschnitten aus Normalgewebe (Abb. 5 & Abb. 6) auf die suprabasalen, eher oberflächlichen Schichten des Plattenepithels. Für das Tumorgewebe werden einmal HPV⁺- und HPV⁻-Schnitte (Abb. 5 & Abb. 6) für S100A8 und S100A9 gezeigt. Zu sehen waren mehrere Expressionsmuster, die zum Teil ebenfalls die supra-/basalen Schichten betrafen, aber auch solche die darüber hinaus in das darunter liegende Gewebe infiltrierend einbrachen. Innerhalb des Gewebes zeigten sich mehrere Abschnitte von stark angefärbten Tumornestern, zum Teil homogen gefärbt, zum Teil aber auch mit einer randständigen Betonung der Färbung. Dazu zeigten sich vereinzelte Zellen, die abseits der Tumornester im umliegenden Tumormikromilieu verstreut waren und am ehesten infiltrierenden Immunzellen entsprachen (Bernhard 2019). Im direkten Vergleich ließ sich erkennen, dass die Färbungen für S100A8 und S100A9 nahezu deckungsgleich waren, die S100A8-Färbung gleichzeitig aber auch eine stärkere Intensität aufwies.

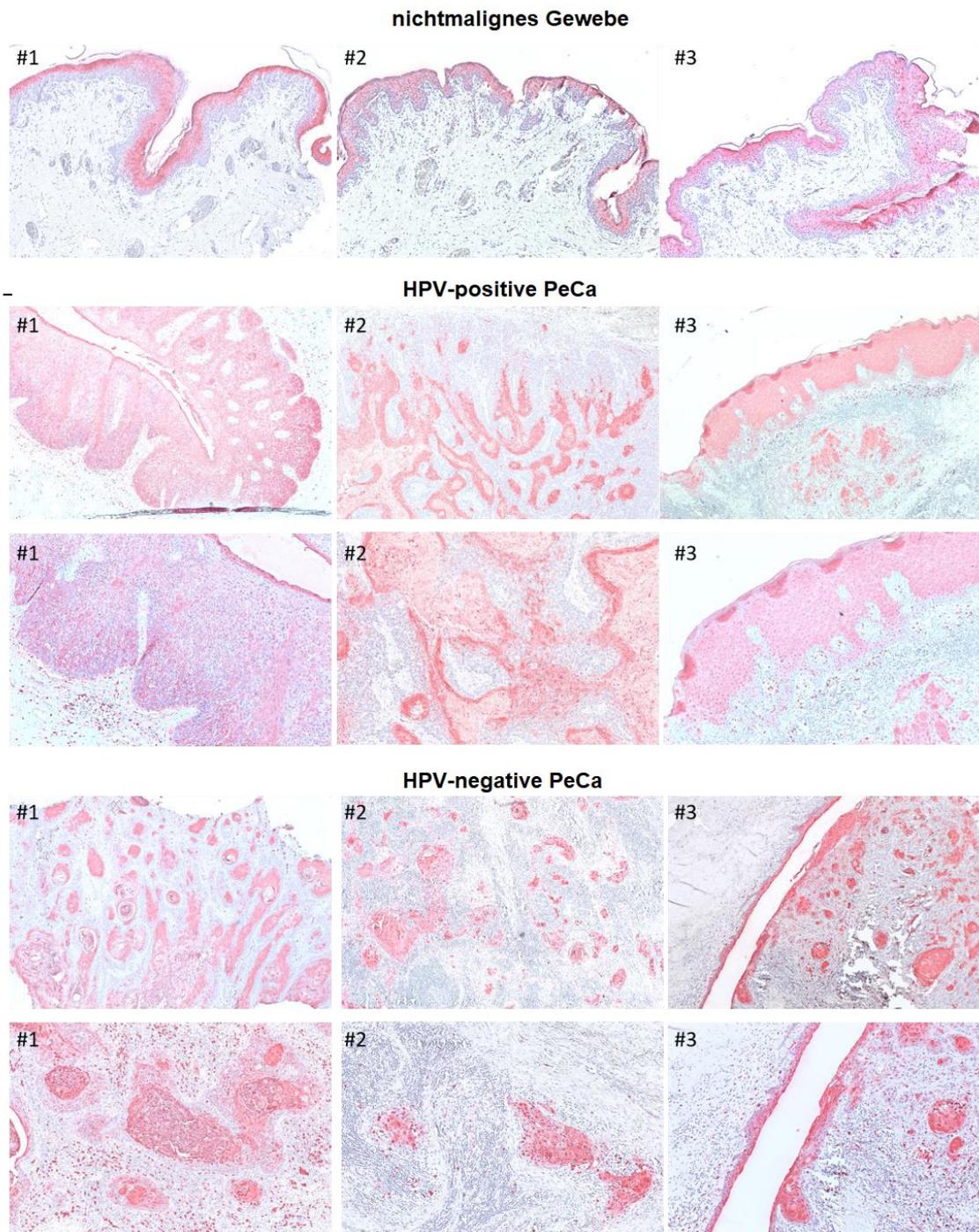


Abbildung 5 Repräsentative Färbung für S100A8 in PeCa-Gewebe:

Immunhistochemische Färbung für S100A8 in nichtmalignem Gewebe (A), HPV-positive Tumoren (B), HPV-negative Tumoren (C)

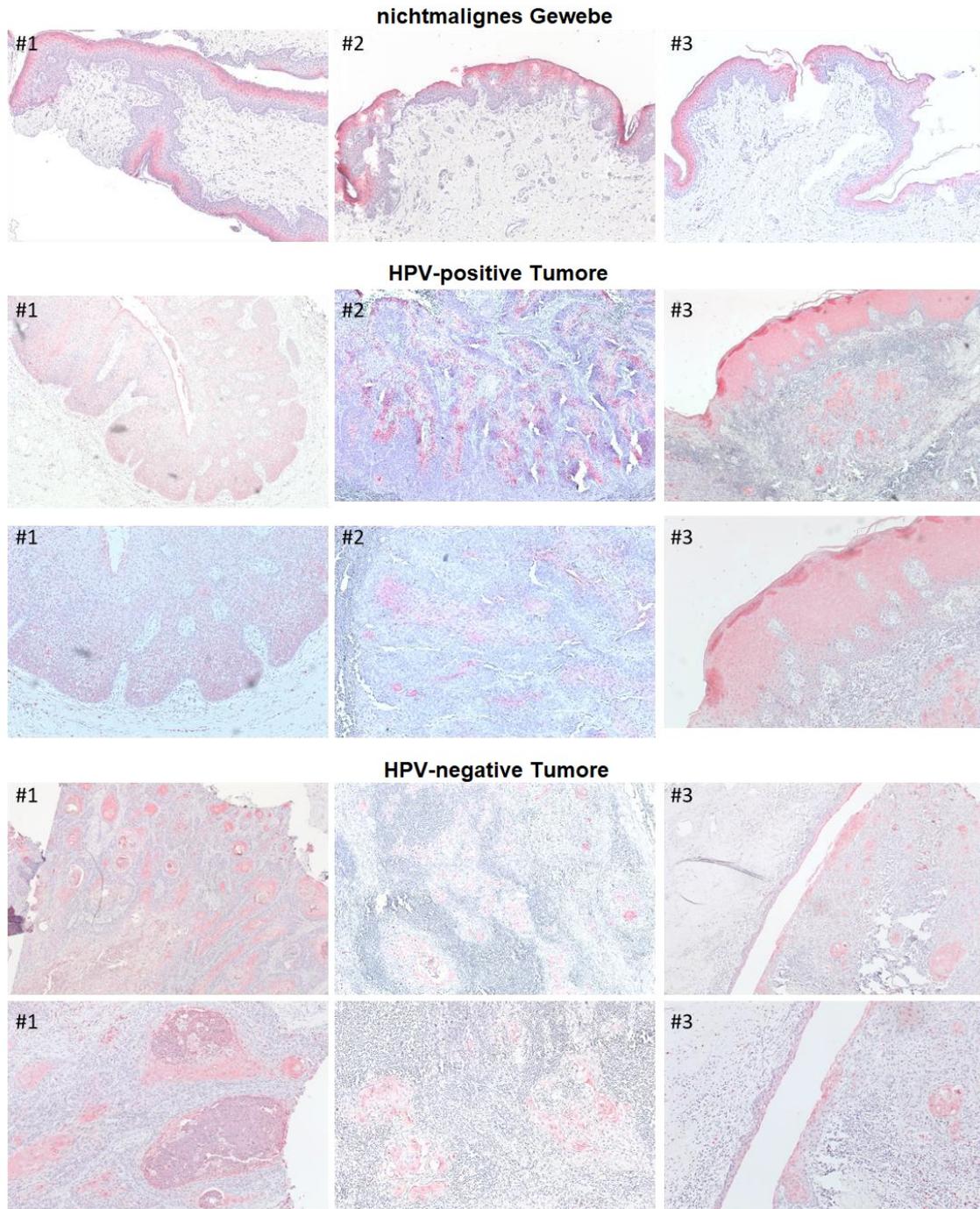


Abbildung 6 Repräsentative Färbung für S100A9 in PeCa-Gewebe:

Immunhistochemische Färbung für S100A9 in nichtmalignem Gewebe (A), HPV-positive Tumoren (B), HPV-negative Tumoren (C)

4.3.3 S10A8/A9-Färbung in 3D-Kulturen peniler Karzinom-Zelllinien und Vorhautkeratinozyten

Aus Tumorgewebe von primären Peniskarzinomen und Lymphknotenmetastasen wurden *in vitro* und in xenotransplantierten SCID -Mäusen Tumor-Zelllinien kultiviert (Naumann,

Sperveslage et al. 2012). Hierdurch konnten erstmals zwei Zelllinien aus penilen SCC und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen etabliert werden. Nach Überführung der in vitro Zellkulturen an das Institut für Virologie am Universitätsklinikum des Saarlandes erfolgte eine PCR zum Nachweis von HPV-DNA sowie eine zweifache Zelllinien-Authentifizierung.

Die aus einem Primarius-abgeleitete (P2) Zelllinie mit der korrespondierenden Lymphknotenmetastasen (L2)-Zelllinie, sowie eine weitere aus Metastasen stammende Zelllinie eines anderen Patienten (L3) wurden dann als organotypische dreidimensionale (3D) Kulturen in Rattenkollagen eingebettet und als Raft-Kultur am Luft-Flüssigkeits-Übergang auf einem Metallgitter kultiviert um ein mehrschichtiges möglichst physiologisches Wachstum zu ermöglichen. Zusätzlich wurden NFKs aus Vorhautgewebe ebenfalls als organotypische dreidimensionale (3D) Kultur angezüchtet, diese wurden vorab mittels PCR negativ auf HPV getestet. Nach Fixation und Paraffineinbettung erfolgte eine IHC-Färbung für S100A8/A9. Die Experimente wurden mit Kultur-Duplikaten und fünffacher Wiederholung durchgeführt. In den hier gezeigten repräsentativen Bildern zeigte sich eine durchgehend kräftige zytoplasmische und teils im Kern hervorgehobene Färbung der NFK für S100A8/A9. Die penile Karzinomlinie (P2) zeigte vereinzelte Nester positiver Zellen mit kräftiger zytoplasmischer Färbung für S100A8/A9, während die korrespondierende LKM (L2) keine Färbung zeigte. Die LKM (L3) zeigte hingegen Nester kräftiger zytoplasmischer Färbung für S100A8/A9 verstärkt im Bereich der Basalzellschicht. Im Vergleich der Gewebefärbungen (Abb. 5/6) sieht man eine vergleichbare kräftige Färbung für S100A8/A9 zwischen dem dargestellten nichtmalignen Gewebe (Abb. 5/6 #1-3) und den NFKs (Abb. 7). Ein zusätzlicher Vergleich mit Normalgewebs-TMAs (NO) war für die S100-Färbungen leider nicht möglich, da diese im Färbeprozess zu stark beschädigt wurden. Das Tumorgewebe (P2) zeigte mit den vereinzelten, jedoch kräftig angefärbten Zellen (Abb. 7) eine ähnliche S100A8/A9 Färbung wie die Tumornester in den Übersichtsschnitten (Abb. 6 HPV^{+/-}-Tumore #1-3) oder die teils vereinzelt eingestreuten Zellen in den TMAs (Abb. 4A/B).

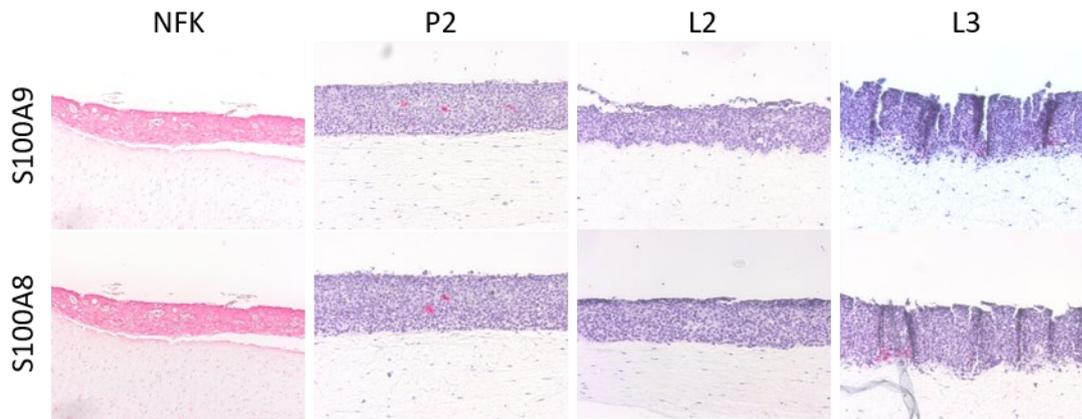


Abbildung 7 Calprotectin-Expression in HPV-positiver 3D-Kulturen von NFK- und PeCa-Zelllinien:

Expression von S100A8 und S100A9 unter Verwendung von IHC und FFPE aus organotypischen 3D-Kulturen von NFK- und PeCa-Zelllinien mit S100A8 und S100A9. Aufnahmen erfolgten mit 20-facher Vergrößerung (0,5 cm = 100 μ M). Bilder sind repräsentative Bilder von fünf unabhängigen Experimenten von drei unabhängigen Kulturen, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

4.3.4 IHC-Kofärbung von S100A8/A9+CD15 der TMAs

Es ist bereits in der Fachliteratur (Sinha, Okoro et al. 2008, Zhao, Hoechst et al. 2012, Yang, Anholts et al. 2018, Huang, Wu et al. 2019) beschrieben, dass beide S100-Untereinheiten kennzeichnend für MDSC des Tumormikromilieus sind und auch in diesen Proben zeigte sich eine bemerkenswerte Menge infiltrierender Zellen, die für beide Untereinheiten positiv waren (Abb.8). MDSC, insbesondere im Tumorzentrum, werden mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht und beeinträchtigen immuntherapeutische Ansätze auf Basis von Immuncheckpoint-Inhibitoren (Si, Merz et al. 2019). Die Expression beider Calprotectin-Untereinheiten weist auf ein Tumormikromilieu hin, in dem aktiv myeloische Zellen rekrutiert werden und sich hier unter anderem zu MDSC differenzieren. Durch die gleichzeitige Koexpression von S100A8/A9 und CD15 lassen sich die infiltrierenden Immunzellen als Neutrophile identifizieren (Ryckman, Vandal et al. 2003). Für die Auswertung der Immunzell-Infiltrate wurde zum einen eine zusätzliche CD15-Färbung für die bereits genutzte TMA-Reihe etabliert (Bernhard, Zwick et al. 2020) und zum anderen auch ein eigenständiger IRS von mir ermittelt, um die Menge infiltrierender Zellen nochmal von der Färbung des eigentlichen Tumorgewebes gesondert zu quantifizieren. Es zeigte sich eine im Vergleich überschneidende Färbung für die zum Teil vereinzelt eingestreuten, aber auch massenhaft auftretenden Immunzellinfiltrate in den Proben der Primärtumore und Lymphknotenmetastasen.

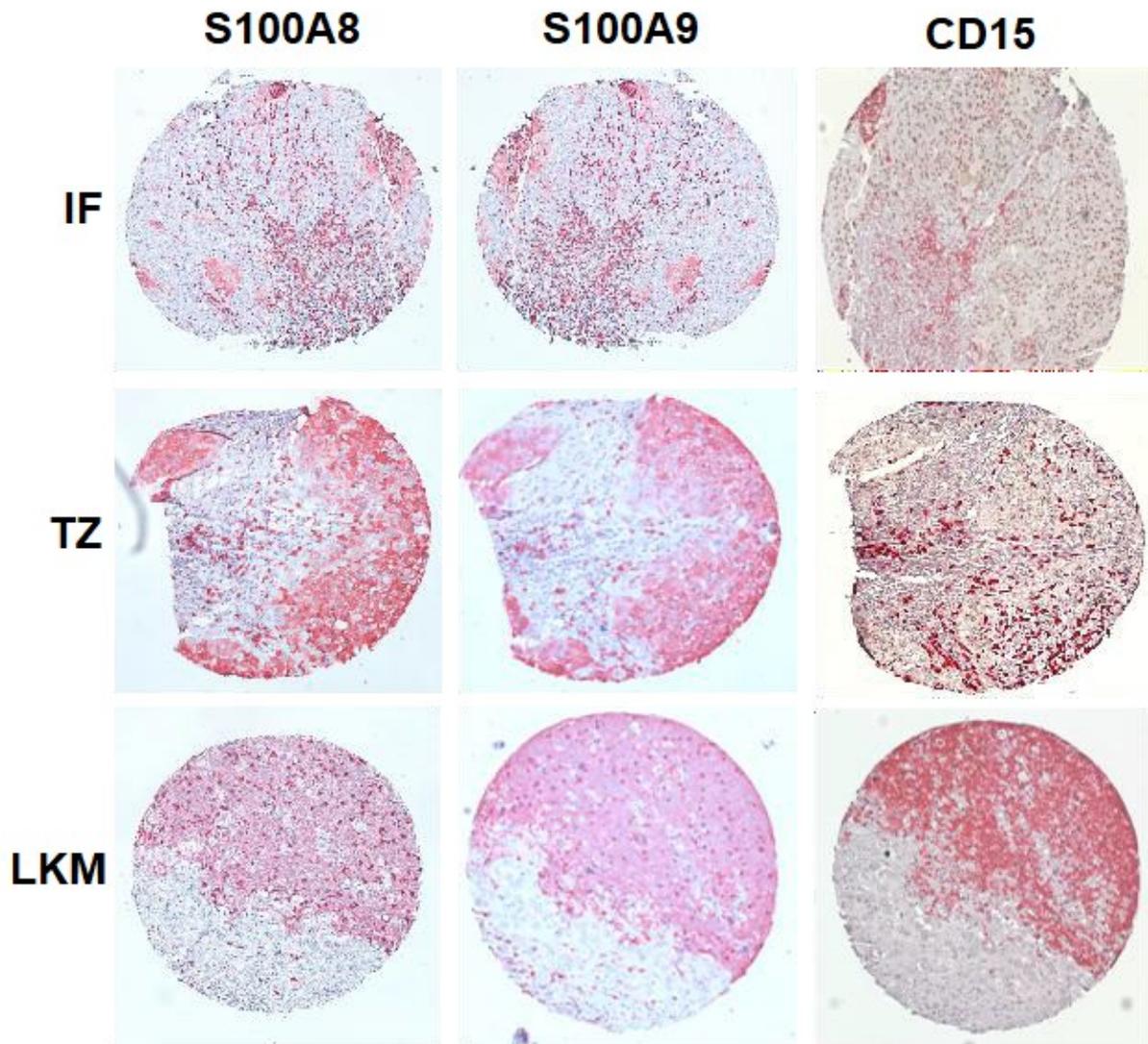


Abbildung 8 Infiltrierende S100A8+S100A9+-Immunezellen in PeCa-Tumoren:

TMA's aus PeCa-Tumoren wurden für S100A8, S100A9 und CD15 immunhistochemisch gefärbt. Hier gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aller drei TMA's aus der Invasionsfront (IF), dem Tumorzentrum (TZ) und Lymphknotenmetastasen (LKM) mit partiell kohärenter Färbung von CD15 mit S100A8 und S100A9

4.3.5 IRS von CD147 (EMMPRIN) der TMA's

Die Eigenschaft von CD147 (EMMPRIN) als Rezeptor für S100A8/A9 auf Tumorzellen und in dem umgebenden TME zu dienen macht es zu einem Faktor der näher betrachtet werden sollte. Bei deutlicher Expression von Calprotectin in Tumorzellen und TME des Tumorzentrums und der Lymphknotenmetastasen sollten also ähnliche Muster bei immunhistochemischen Untersuchungen von CD147 reproduzierbar sein. In der Auswertung der immunhistochemischen Färbung für CD147 wurde neben den Tumorproben des

Tumorzentrum (TMA TZ, n = 60), der Invasionsfront (TMA IF, n = 54) und korrespondierenden LKM (TMA LKM, n = 14) zusätzliches Normalgewebe (TMA NO, n = 32) untersucht. Die Schnitte wurden in Zusammenarbeit für die Publikation (Mohr, Zwick et al. 2022) immunhistochemisch gefärbt und diese Färbung anschließend nach dem IRS nach Remmele & Stegner durch mich bewertet. Die Schnitte wurden dann über ein von mir erstelltes Raster den Patienten zugeordnet und ausgewertet. Als HPV-positiv wurden Tumore gewertet, bei denen ein positiver Nachweis in der PCR für HPV-DNA und in der IHC für den Surrogat-Marker p16^{INK4a} vorlag. Die Grafik (Abb. 9) zeigt zunächst als Übersicht die verschiedenen IRS-Grade anhand exemplarischer TMA-Färbungen für CD147, hier gezeigt mit repräsentativen Aufnahmen der TMAs aus Tumorgewebe (Abb. 9A) sowie im direkten Vergleich zwischen den drei verschiedenen Tumorbereichen (IF, TZ, LKM) und dem Normalgewebe (NO) (Abb. 9B). Hierbei zeigten sich verschiedene Intensitäten der Färbung mit unterschiedlicher Färbung der einzelnen Zellelemente der Membran, des Zytoplasmas und des Nukleus. So zeigten die Tumornester teils eine flächige zytoplasmatische Färbung in verschiedener Graduierung oder auch mit einer randständigen Betonung. Das Normalgewebe wiederum zeigte nur eine sehr dezente und vornehmlich suprabasale Färbung. Insgesamt waren die beobachteten Färbemuster vergleichbar mit den der vorherigen Färbung von Calprotectin (S100A8/A9).

Die ausgewerteten Patientenproben aus IF, TZ, LKM und NO sind in ihrer Gesamtheit anhand ihres IRS und unter Berücksichtigung des HPV-Status (Abb. 9C) dargestellt. In der IF sowie dem TZ fanden sich mehr Proben mit CD147 negativem IRS in der HPV-positiven Subgruppe. Auch im Normalgewebe zeigte sich ein gleichartiges Phänomen mit deutlich mehr Proben mit CD147 negativem IRS in der HPV-positiven Subgruppe. Es zeigten sich wie bereits bei der Färbung für S100A8/A9 alle Lymphknoten mit einem positiven Färbescore. In der direkten Gegenüberstellung der 3 verschiedenen Tumorareale zum dazugehörigen Normalgewebe zeigte das Tumorgewebe statistisch signifikant häufiger ein positives Scoring (IF HPV⁻ vs. NO HPV⁻ (*p=0,0486), TZ HPV⁺ vs. NO HPV⁺ (*p=0,0306), LKM HPV⁺ vs. NO HPV⁺ (**p=0,0074)) (Abb. 9D). Vergleicht man untereinander die verschiedenen Tumorregionen zeigten sich auch hier zum einen Unterschiede zwischen den 3 TMA-Gruppen (IF HPV⁺ vs. TZ HPV⁻ (*p=0,0196), IF HPV⁺ vs. LKM HPV⁺ (*p=0,0131)) als auch innerhalb einer TMA-Gruppe bei ungleichem HPV-Status (IF HPV⁺ vs. IF HPV⁻ (**p=0,0070)) (Abb. 9E). Die IHC-Färbung für CD147 war somit vergleichbar mit den Ergebnissen, die sich bereits für die S100-Proteine gezeigt haben. Die LKM waren alle deutlich positiv und das TZ wies eine stärkere Positivität auf als die IF. Durch Hinzunahme von NO der Vorhaut zeigte sich im direkten Vergleich, dass Proben aus den verschiedenen Tumorarealen (IF, TZ, LKM) eine statistisch signifikantere

Expression aufwiesen. Hinsichtlich der Abhängigkeit vom HPV-Status der Proben zeigte sich nur im Vergleich von HPV^{+/-}-Proben der IF sowie zwischen IF HPV⁺ und TZ HPV⁻ ein statistisch signifikanter Unterschied in der CD147-Expression. Hier war also ein klarer Zusammenhang zwischen HPV-Status und EMMPRIN nicht für alle Proben ersichtlich, deshalb wurden im Folgenden noch weitere Korrelationen mit verschiedenen histopathologischen sowie klinischen Markern getestet.

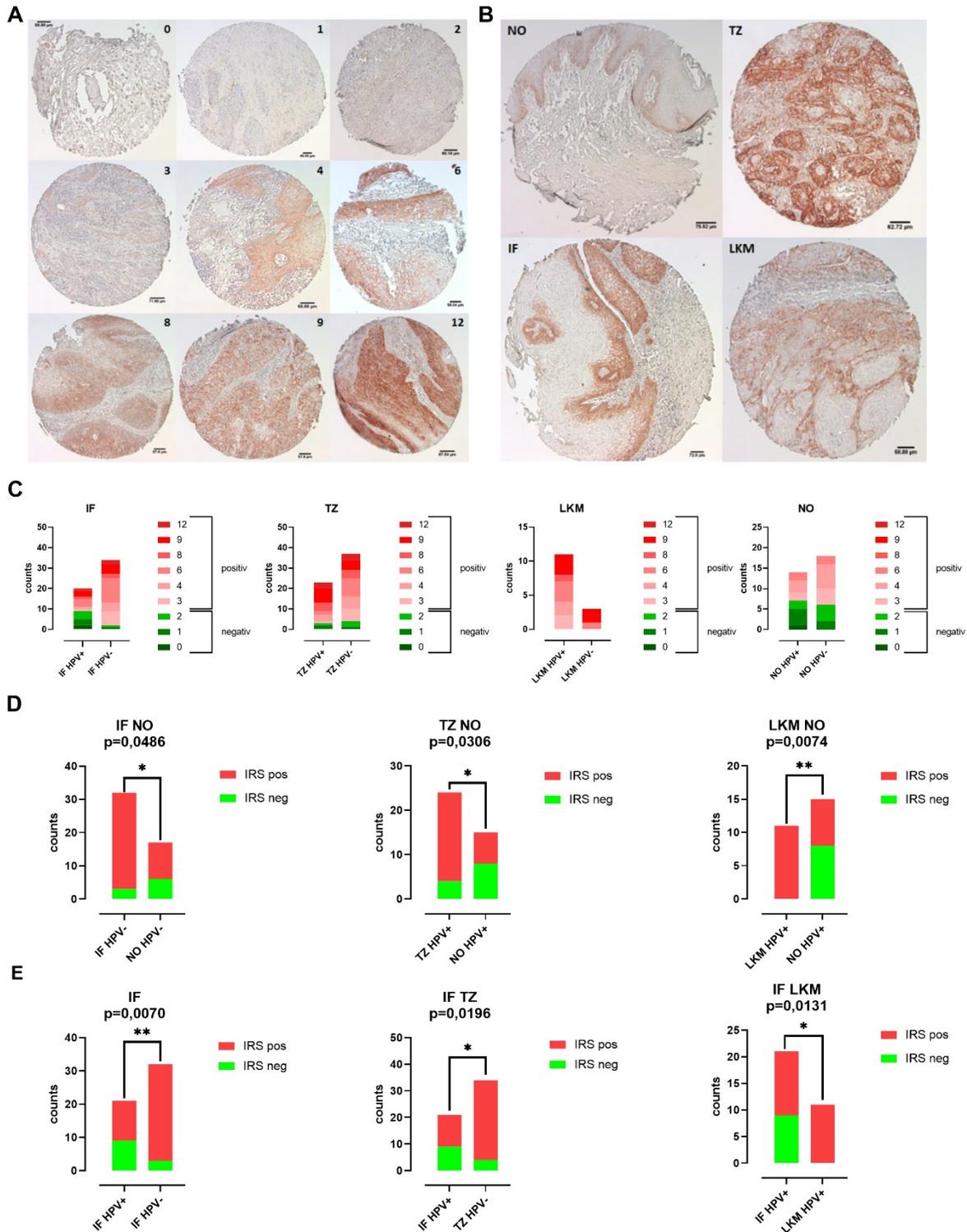


Abbildung 9 IRS der PeCa-Proben für die CD147:

Übersicht der verschiedenen IRS-Grade anhand exemplarischer TMA-Färbungen für CD147. Repräsentative Aufnahmen aller drei TMAs aus der Invasionsfront (IF), dem Tumorzentrum (TZ) und Lymphknotenmetastasen (LKM) (A) sowie der von Normalgewebe (NO) im Vergleich zum Tumorgewebe (B) Nach Remmele und Stegner setzt sich der Score aus der Färbeintensität und der Anzahl gefärbter Zellen pro Probe zusammen. Proben aus IF, TZ, LKM und NO sind in ihrer Gesamtheit

anhand ihres IRS (C) dargestellt. Gegenüberstellung der IRS aus Tumor- und Normalgewebe unter Berücksichtigung des HPV-Status. Hier zeigte sich das Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe häufiger und intensiver gefärbt als das Normalgewebe mit einem statistisch signifikanten Unterschied von $p \leq 0,01$ zwischen IF HPV- vs. NO HPV- (*0,0486), TZ HPV+ vs. NO HPV+ (*0,0306), LKM HPV+ vs. NO HPV+ (**0,0074) im Fisher's exact test (D). Im direkten Vergleich der Färbung zwischen der TMAs zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen der gleichen Tumorregion bei ungleichem HPV-Status (IF HPV+ vs. IF HPV- ** $p=0,0070$) und zwischen den verschiedenen Tumorregionen (IF HPV+ vs. TZ HPV- *0,0196, IF HPV+ vs. LKM HPV+ *0,0131) im Fisher's exact test (E). Färbung wurde in Zusammenarbeit durchgeführt (Mohr, Zwick et al. 2022)

4.4 S100A8⁺S100A9⁺CD15⁺-positives Immuninfiltrat als Charakteristikum in HPV-positive PeCa Proben

In den unten aufgeführten Gewebsschnitten aus PeCa-Tumoren zeigte sich eine hohe Zahl infiltrierender Immunzellen, die intensiv für S100A8 und S100A9 gefärbt waren (Abb. 10A). Während in gesundem Vorhautgewebe (NO) nur vereinzelt S100A8⁺S100A9⁺-Immunzellen zu beobachten waren, änderte sich dies im direkten Vergleich mit den PeCa-Proben (IF, TZ, LKM) drastisch. Es zeigte sich eine intensive zytosolische Färbung der das Tumormikromilieu infiltrierenden und der den Tumor durchwandernden Immunzellen in der Invasionsfront, des Tumorzentrums und den Lymphknotenmetastasen (Abb. 10A). Im Vergleich der Aufnahmen mit denen der TMAs (Abb. 8) zeigte sich, dass die dort dargestellte kohärente Färbung von S100A8⁺S100A9⁺CD15⁺-Immunzellen auch hier zu finden waren, was das Vorhandensein von neutrophilen MDSC hindeutete. In einer früheren Publikation wurde bereits ein CXCL8-abhängigen Mechanismus in der Chemotaxis von Neutrophilen bei HPV⁺CD15⁺ PeCa-Proben beschrieben, der mit einem höheren TNM-Status hinsichtlich Invasion und Metastasierung einherging (Bernhard, Zwick et al. 2020). Hierauf aufbauend erfolgte die Stratifizierung der TMAs (IF, TZ, LKM) für die S100A8⁺A9⁺-positiven Tumorgewebe hinsichtlich eines möglichen invasiven Wachstums (pT1b-pT4), Metastasierung ($\geq pN1$) und des HPV-Status (Abb. 10B, D, F). Dem gegenüber gestellt erfolgte die gleiche Auswertung für ein hohes TNM-Grading (invasives Wachstum, Metastasierung) und den HPV-Status für die IHC-Kofärbung (S100A8/A9⁺CD15⁺) infiltrierender Immunzellen (Abb. 10C, E, G). Es zeigte sich erneut die im Vergleich zur Invasionsfront und Tumorzentrum deutlich höhere Rate an HPV-positiven Proben bei den Lymphknotenmetastasen. Patienten deren Tumore ein invasives Wachstum oder eine Metastasierung zeigten wiesen in den Proben der drei Tumorareale ebenso vermehrt einen HPV-positiven Status auf. Des Weiteren wiesen auch Patienten mit einem S100A8/A9⁺CD15⁺-

Immuninfiltrat zu einem höheren Anteil einen HPV-positiven Status in diesem Kollektiv auf. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Daten überein, die die Neutrophilen-Infiltration zum einen mit einem positiven HPV-Status und zum anderen mit invasiv wachsenden und früh metastasierten Tumorentitäten in Verbindung bringen (Hölters, Khalmurzaev et al. 2019, Bernhard, Zwick et al. 2020). Dieses Markerprofil könnte so ein Hinweis auf ein prognostisch nachteiliges TME sein mit einer höheren Rate an invasivem Wachstum und dem prognostisch wichtigen Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen bei Erstdiagnose.

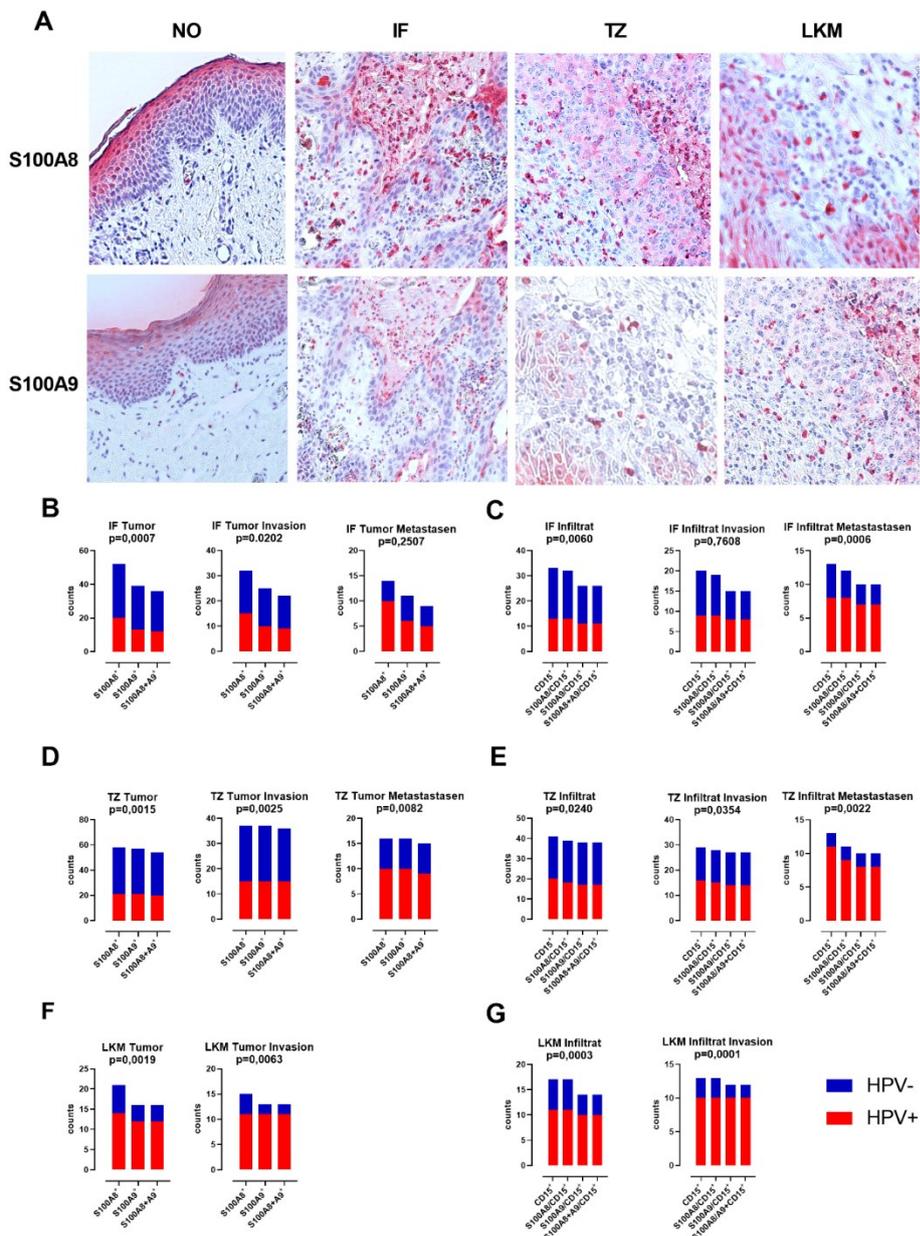


Abbildung 10 S100A8/A9 ist assoziiert mit HPV-positiven, invasiven, metastasierten Peniskarzinomen mit infiltrierenden Neutrophilen:

A) IHC-Färbung (S100A8⁺/A9⁺) infiltrierender Immunzellen im Normalgewebe (NO) und Tumorgewebsschnitten der Invasionsfront (IF), dem Tumorzentrum (TZ) und Lymphknotenmetastasen (LKM). Darstellung der S100A8⁺A9⁺-positiven Proben der TMAs (IF, TZ, LKM) alleine und unter Einbeziehung von invasivem und metastasierendem Wachstum, jeweils unterteilt nach dem HPV-Status der Probe (B, D, F). In Gegenüberstellung zu der Tumorfärbung mit S100A8/A9 erfolgte die gleiche Auswertung für invasives und metastasierendes Wachstumsverhalten unter Berücksichtigung des HPV-Status für das untersuchte S100A8⁺/A9⁺+CD15⁺-Immuninfiltrat (C, E, G).

4.5 Das HPV⁺S100A8⁺S100A9⁺CD15⁺-Markerprofil zeigt unterschiedliche Ausprägungen unter den Subtypen

Neben der Unterteilung des untersuchten Kollektivs in die drei verschiedenen Tumorareale (IF, TZ, LKM) wurden die PeCa-Proben auch anhand des histologischen Subtyps unterschieden und ausgewertet. In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass eine aktive HPV-Transformation mit unterschiedlichen histologischen Subtypen assoziiert ist und prognostischen Wert hat (Hölter, Khalmurzaev et al. 2019, Olesen, Sand et al. 2019, Bernhard, Zwick et al. 2020), auch hinsichtlich dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Da sich die Onkogenese von HPV-assoziierten Tumoren und solchen ohne Zusammenhang zu einer aktiven oder stattgehabten HPV-Infektion unterscheiden folgen auch verschiedene Eigenschaften der Tumore. Die hier untersuchten PeCa-Proben wurden in 14 verschiedene histologische Subtypen eingeteilt: 1 Plattenepithelkarzinom (SCC) normaler Typ, 2 Pseudohyperplastisches Karzinom, 3 Pseudoglanduläres Karzinom, 4 Reines verruköses Karzinom, 5 Carcinoma cunicolatum, 6 Papilläres Karzinom, NOS, 7 Adenosquamöses Karzinom, 8 Sarkomatoides SCC, 9 Gemischtes Karzinom, 10 Papillär-basaloides Karzinom, 11 Warzig-basaloides Karzinom, 12 Warziges Karzinom, 13 Basaloides Karzinom und 14 Klarzelliges Karzinom.

Die Subtypen-Auswertung erfolgte für die bereits zuvor beschriebenen Subtypen 1-14 unter Ausschluss der Tumorproben ohne dokumentierten histologischen Subtyp. Die erste Auswertung erfolgte für die S100-Proteine (S100A8/A9) für die einzelne und doppelte Positivität der IHC-Marker (Abb. 11A), sowie unter Hinzunahme des HPV-Status (Abb. 11B). Darauf aufbauend habe ich die separat untersuchte Immunzell-Infiltration (S100A8⁺/S100A9⁺ + CD15⁺) für die einzelne als auch doppelte Positivität untersucht (Abb. 11C) und auch mit Auswertung für den HPV-Status (Abb. 11D). S100A8⁺/S100A9⁺-Proben sowie dreifach positive PeCa-Proben (S100A8⁺S100A9⁺CD15⁺) entfielen hauptsächlich auf den Subtyp 1, das gewöhnliche SCC, gefolgt von den HPV-assoziierten warzig-basaloiden und basaloiden

Karzinomen (11, 13) bezüglich des Tumorzentrum und der Invasionsfront (Abb.11A, C). Das gewöhnliche SCC war hierbei der statistisch am häufigsten auftretende und so auch in unserem Kollektiv der numerisch am stärksten vertretene Subtyp. Bei den Lymphknotenmetastasen zeigte sich hier eine Angleichung auf das Niveau der HPV-assoziierten Subtypen hinsichtlich der Zweifach- und Dreifach-Positivität. Hier zeigte sich neben der Bestätigung eines Anteils an der hohen HPV-Positivität der Subtypen 11-14 (Abb.11C, D) auch, dass das hier gezeigte Markerprofil für Tumorgewebe und das darin vorhandene Immuninfiltrat normiert auf die Patientenanzahl überproportional häufig positiv war. Die höchste Anzahl an S100A8⁺S100A9⁺CD15⁺HPV⁺-Proben entfiel auf die histologischen Subtypen des basaloiden und des warzig-basaloiden Karzinoms, gefolgt vom gewöhnlichen SCC und klarzelligem Karzinom.

Zur Berechnung der Korrelation zwischen den etablierten Markern (S100A8, S100A9, CD15 und HPV-Staus) für die unterschiedlichen Tumorareale der TMAs (IF, TZ, LKM) erfolgte die Berechnung mittels Pearson-Korrelationskoeffizient (r) und Darstellung in einer Heatmap (Abb.11E). Bei anzunehmendem linearem Zusammenhang und kardinal skalierten Ergebnissen der Auswertung werden die Ergebnisse hier in einer Schwankungsbreite von +1 (perfekt positiver Zusammenhang) bis -1 (perfekt negativer Zusammenhang) und 0 bei fehlendem Zusammenhang beschrieben (Abb. 10E, obere Reihe). Es zeigte sich hier eine deutliche Korrelation zwischen den S100-Proteinen (S100A8/A9) untereinander, sowie zu dem verwendeten Immuninfiltrat-Marker CD15 in der Infiltrationsfront und dem Tumorzentrum. Für die Lymphknotenmetastasen zeigte sich zusätzlich zu diesen Markern eine weitere Korrelation mit einem positiven HPV-Status. In einer weiteren Berechnung für entsprechende p-Werte aus dieser Korrelation (Abb. 10E, untere Reihe) zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation für die Infiltrationsfront (p-Wert= 10^{-6} - 10^{-7}) und das Tumorzentrum (p-Wert= 10^{-6} - 10^{-8}) für S100A8, S100A9 und CD15. Für die Lymphknotenmetastasen zeigte sich entsprechend eine statistisch signifikante Korrelation für S100A8, S100A9 und CD15 und einen positiven HPV-Status (p-Wert= 10^{-3} - 10^{-7}).

Aus den hier dargestellten Ergebnissen ergab sich ein möglicher Zusammenhang zwischen Neutrophilen-Infiltration und dem histologischen Subtyp. Das verstärkte Auftreten infiltrierender Neutrophile in diesen Subtypen könnte hierbei im Zusammenhang mit der bestehenden HPV-Assoziation und den konsekutiven Alterationen stehen oder generell für diesen Subtyp zutreffen. Vorerst zeigte sich jedoch ein verstärktes Auftreten des gezeigten S100A8⁺S100A9⁺CD15⁺HPV⁺-Markerprofils bei HPV-assoziierten histologischen Subtypen.

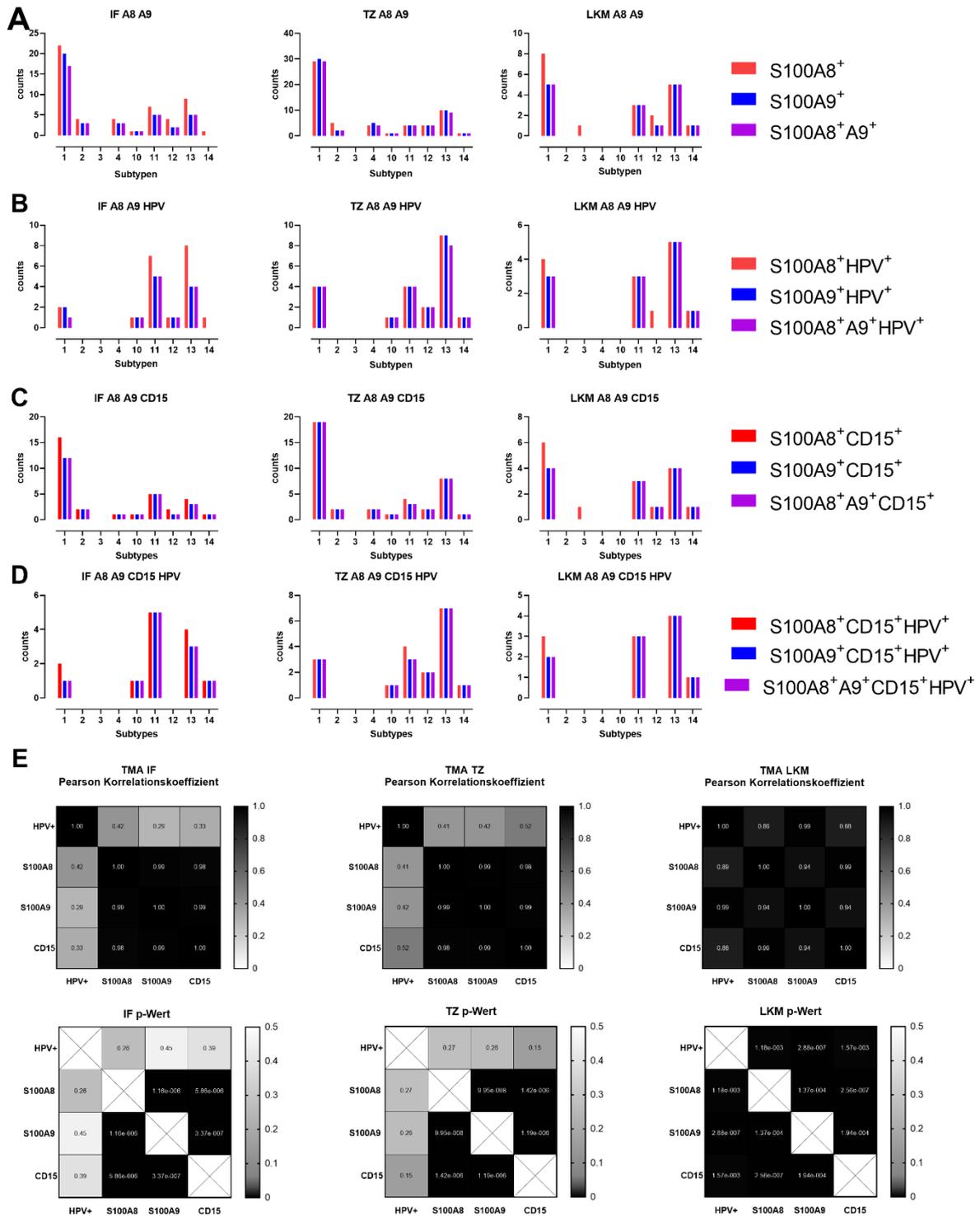


Abbildung 11 Korrelation von S100A8, S100A9, CD15 und positivem HPV-Status mit dem histologischen Subtyp:

Auswertung der PeCa-Subtypen (1-14) nach Positivität für S100A8, S100A9 oder Beidem (A), einem positiven HPV-Status (B), CD15 positivem Immuninfiltrat (C) und einer Kombination aus allen 4 Parametern (S100A8+S100A9+CD15+HPV+) (D). Korrelation für jeden Parameter allein und in Kombination mit den histologischen Subtypen. Pearson Korrelation Koeffizienten (obere Reihe) und

die jeweiligen p-Wert (untere Reihe) stellen die Färbung aller 4 Parameter für die unterschiedlichen TMAs als Heatmap dar (E).

4.6 Erhöhte Expression des IHC-Markerprofils in PeCas als Prädiktor einer disseminierten Erkrankung

4.6.1 S100A8/A9

Zur näheren Betrachtung des möglichen Potentials von S100A8 und S100A9, sowie dem HPV-Status als korrelierende Marker für ein invasives Wachstum oder eine Metastasierung habe ich die einzelnen TMAs der Invasionsfront, Tumorzentrum und Lymphknotenmetastasen miteinander verglichen. Für die Invasionsfront invasiv wachsender Tumore war sowohl S100A8- (HPV⁺ 15/20 vs. HPV⁻ 17/32) als auch S100A9-Positivität (HPV⁺ 10/13 vs. HPV⁻ 15/26) mit einem häufigeren Auftreten eines positiven HPV-Status verbunden, wenn auch ohne statistische Signifikanz. In der Invasionsfront von Tumoren mit Metastasen zeigten sich signifikant (**p=0,0045) mehr Metastasen bei S100A8⁺HPV⁺-Tumoren (10/20) als bei S100A8⁺HPV⁻-Tumoren (4/28), dies galt nicht für S100A9 (HPV⁺ 6/13 vs. HPV⁻ 5/21, p=0,1306) (Abb. 12A).

Im Tumorzentrum verhält es sich ähnlich wie an der Invasionsfront, es zeigte sich eine verstärkte Invasivität bei Tumoren die sowohl S100A8 (HPV⁺ 15/21 vs. HPV⁻ 22/37, *p=0,4078)/A9- (HPV⁺ 15/21 vs. HPV⁻ 22/36, p=0,5675) wie auch HPV-positiv waren. Bei metastasierten Tumoren zeigte sich sowohl bei S100A8 (HPV⁺ 10/21 vs. HPV⁻ 6/37, *p=0,0151) wie S100A9 (HPV⁺ 10/21 vs. HPV⁻ 6/36, *p=0,0166), dass ein zusätzlich positiver HPV-Status häufiger mit Metastasen verbunden war als bei S100A8⁺/S100A9⁺HPV⁻-Tumoren (Abb. 12B).

Bei Lymphknotenmetastasen (LKM) verhält es sich gleichartig, es zeigte sich eine höhere Rate an invasivem Wachstum bei S100A8⁺(HPV⁺ 11/14 vs. HPV⁻ 4/7, p=0,3544)/S100A9⁺(HPV⁺ 11/12 vs. HPV⁻ 2/4, p=0,1357)-positiven Tumoren mit positivem HPV-Status als bei solchen die HPV negativ waren (Abb. 12C).

Tumore mit einem positiven HPV-Status zeigten häufiger ein invasives Wachstum, als solche bei denen kein HPV nachgewiesen werden konnte (HPV⁺ 19/29 vs. HPV⁻ 27/45, p=0,8064). Noch deutlicher wird das im metastasierten Szenario, hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied (**p=0,0015) zwischen HPV-positiven (15/29) und negativen Tumoren (7/45) (Abb. 12D).

In Übereinstimmung mit früheren Daten (Hölters, Khalmurzaev et al. 2019, Bernhard, Zwick et al. 2020) ergaben sich daher weitere Hinweise darauf, dass Patienten mit einem Peniskarzinom, die sich mit einem HPV-assoziierten histologischen Subtypen und mit neutrophiler Infiltration des Tumoren präsentieren, ein höheres Risiko für einen aggressiveren schlechter differenzierten Tumor (Abb. 15) mit frühem infiltrativen Wachstum und Leistenlymphknotenbefall (Abb. 13) bei Diagnosestellung haben. Die hier vorliegenden Daten zeigten, dass das S100A8⁺S100A9⁺HPV⁺-Markerprofil, das mit CD15⁺ für das Immuninfiltrat erweitert werden kann, PeCa-Patienten mit einem höheren Risiko für eine schlechte Prognose charakterisiert.

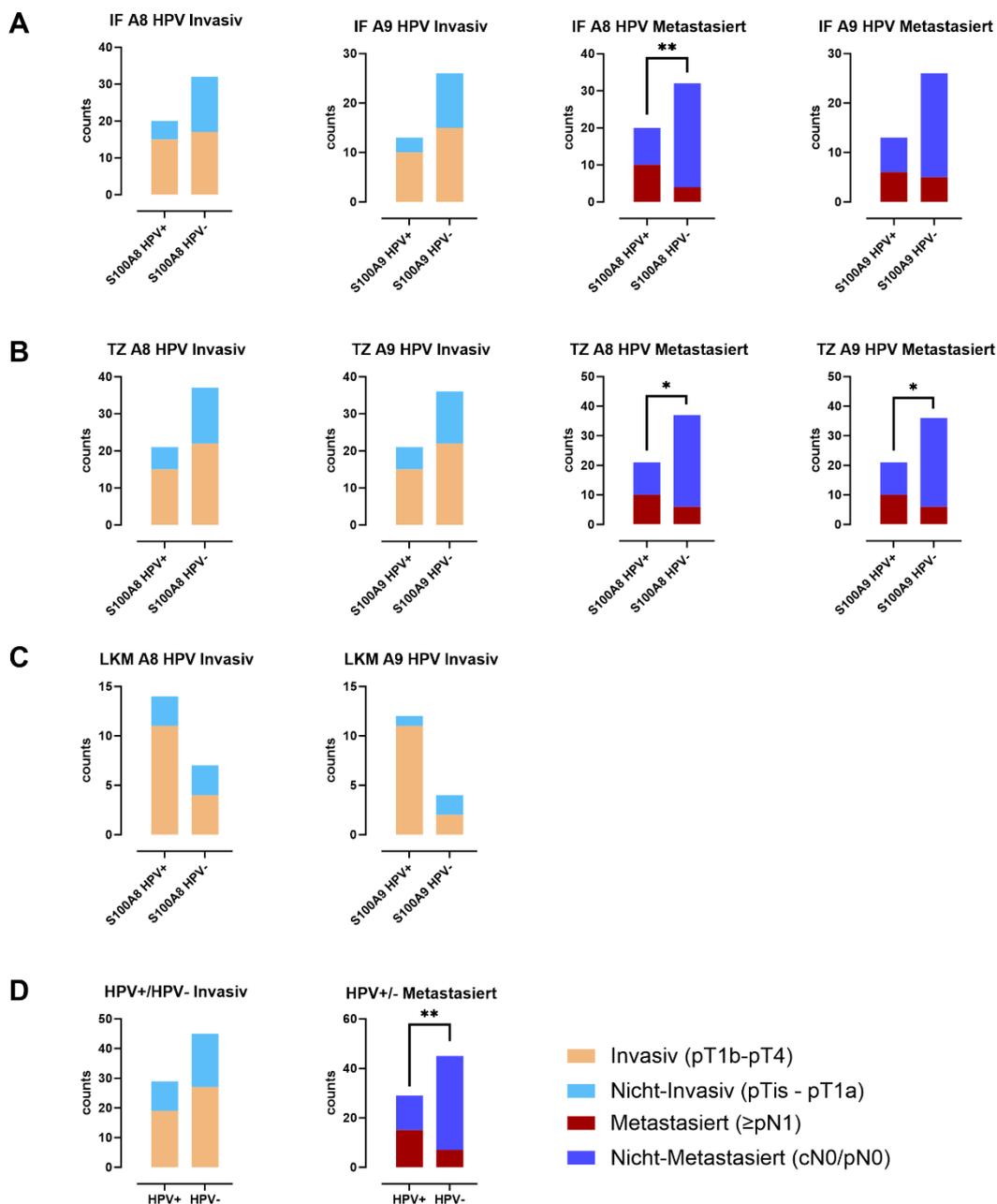


Abbildung 12 Korrelation der Invasivität und der Metastasierung mit S100A8, S100A9 und HPV-Status des untersuchten PeCa-Kollektivs:

Vergleich zwischen Tumoren mit invasivem (pT1b-pT4) und nicht-invasivem (pT0-pT1a) Wachstum, sowie dem Vorhandensein von Metastasierung (pN1-4) und keiner Metastasierung (pN0). A) Betrachtung des invasiven Wachstums und der Metastasierung (A8⁺HPV⁺ 10/20 vs. A8⁺HPV⁻ 4/28, **0,0045) in der Invasionsfront in Korrelation mit S100A8 und S100A9, sowie des HPV-Status. B) Betrachtung des invasiven Wachstums und der Metastasierung im Tumorzentrum in Korrelation mit S100A8 (Metastasiert HPV⁺ 10/21 vs. HPV⁻ 6/37, *0,0151) und S100A9 (Metastasiert HPV⁺ 10/21 vs. HPV⁻ 6/36, *0,0166), sowie des HPV-Status. C) Betrachtung des invasiven Wachstums und der Metastasierung in Lymphknotenmetastasen in Korrelation mit S100A8 und S100A9, sowie des HPV-Status. D) Invasives Wachstum und Metastasierung und des jeweiligen HPV-Status in Betrachtung des Gesamtkollektivs. Ein signifikanter Unterschied (HPV⁺ 15/29 vs. HPV⁻ 7/45, **0,0015) zeigte sich in der Metastasierung zwischen HPV-positiven und negativen Tumoren, nicht jedoch bei invasivem Wachstum. Berechnung mit Fisher's exact test.

4.6.2 Charakterisierung der CD147-Expression in PeCa

Auf Grund des wie bereits zuvor beschriebenen Einflusses von CD147 auf das TME und so möglicherweise auch auf die Tumorexpression bei Hochregulation habe ich mögliche Zusammenhänge zwischen der Expression von CD147 und invasivem Wachstum (pT1b-pT4) sowie Metastasierung (\geq pN1) in diesem Kollektiv untersucht. Zuallererst habe ich das Auftreten von invasivem Wachstum (Abb. 13A) und Metastasierung (Abb. 13B) bei Tumorproben (IF, TZ, LKM) und dem dazugehörigen Normalgewebe (NO) in Zusammenhang mit einem positiven oder negativem IRS für CD147 betrachtet. Hierbei zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation, so dass bei der Fallzahl dieses Kollektivs nicht von einem monokausalen Zusammenhang auszugehen war. In einem nächsten Schritt habe ich nur die CD147⁺-Proben unter Hinzunahme des HPV-Status erneut für invasives Wachstum und Metastasierung betrachtet (Abb. 13C/D). Hierbei zeigte sich ein statistisch signifikant häufigeres Auftreten von Metastasen (Abb. 13D) bei HPV⁺-Status in Tumorproben (IF ** p=0,0096, TZ **** p<0,001) und dem dazugehörigen Normalgewebe (NO * p=0,0379). Für invasives Wachstum ergab sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 13C).

Unter den bereits zuvor dargestellten Färbungen und dazugehörigen Berechnungen für dieses Kollektiv zeigte sich, dass alle HPV⁺ TMA-Proben aus Lymphknotenmetastasen ein positives Scoring für S100A8/A9, CD15 und CD147 aufwiesen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein positiver HPV-Status und der Nachweis von CD147 ein höheres Risiko für

Lymphknotenmetastasen darstellen, woraus sich ein prädiktiver Wert aus der Calprotectin-CD147-Achse bei HPV⁺-Peniskarzinomen ableiten lassen könnte.

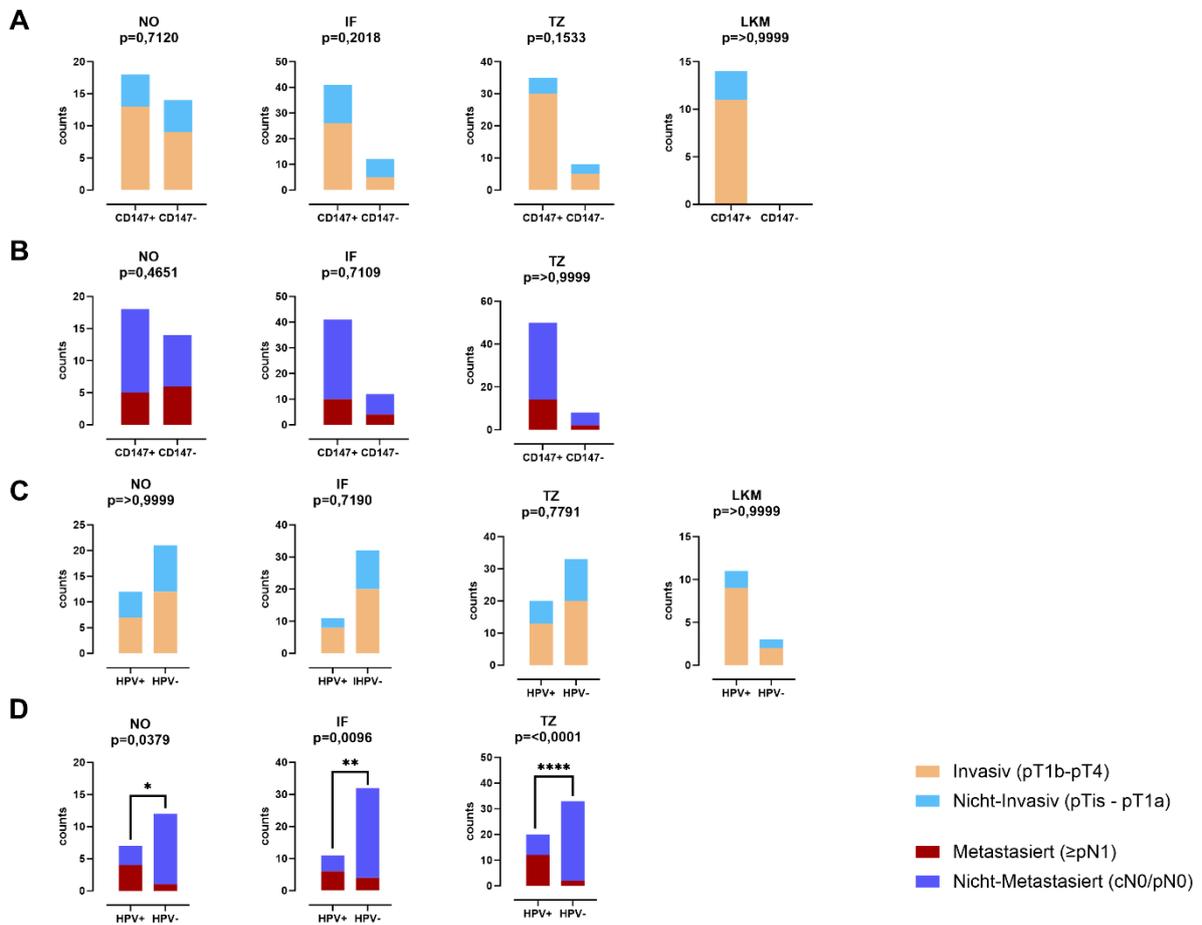


Abbildung 13 Korrelation des CD147-Status mit invasivem Wachstum und Metastasierung:

Vergleich von invasivem Wachstum (pT1b-pT4) an den Tumorgewebsproben (IF, TZ, LKM) und dem dazugehörigen Normalgewebe in Abhängigkeit von positivem oder negativem IRS von CD147 (A). Auftreten von Metastasen (≥pN1) in Proben des Tumorgewebes (IF, TZ) und dem dazugehörigen Normalgewebe in Abhängigkeit von positivem oder negativem IRS von CD147 (B). Untersuchung des invasiven Wachstums (C) und Auftretens von Metastasen (D) unter Berücksichtigung des HPV-Status mit statistisch signifikant häufigerem Auftreten von Metastasen und HPV⁺-Status in Tumorproben (IF **0,0096, TZ ****<0,001) und dem dazugehörigen Normalgewebe (NO *0,0379) im Fisher's exact test.

4.7 Assoziation des Biomarker-Profiles mit invasivem und metastasierenden Wachstum der verschiedenen PeCa-Subtypen

Unter Betrachtung der hier etablierten immunhistochemischen Biomarker und des HPV-Status zeigt die folgende Abbildung mögliche Korrelationen mit invasivem Wachstum (pT1b-pT4) und dem Auftreten von Metastasen (pN1-N3) unter Einschluss der verschiedenen histologischen Subtypen. Die Calprotectine S100A8 und S100A9 sind hier zum einen Marker für den Tumor selbst und zum anderen in Kombination mit CD15 für eine neutrophile Immuninfiltration des Tumors. Dies erlaubt mit dem einbezogenen TNM der Proben eine nähere Betrachtung, ob diese Marker für ein mögliches Risiko-Scoring-Modell für frühinvasives Wachstum und ausgedehnte metastasierte Erkrankungen geeignet sind. Außerdem kann so auch der jeweilige Subtyp als potenziell unabhängiger Risikofaktor untersucht werden. Durch die Kombination mit dem HPV-Status ist neben der Plausibilitätskontrolle hinsichtlich der in der Literatur beschriebenen HPV-assoziierten Subtypen und der dort angegebenen durchschnittlichen Prognose dieser Subtypen auch eine Einschätzung möglich, ob ein positiver HPV-Status unabhängig vom Subtyp mit einer besseren oder schlechteren Prognose assoziiert ist.

Initial erfolgte die Unterteilung der analysierten PeCa-Proben aus allen drei Tumorarealen (IF, TZ und LKM) in die verschiedenen histopathologischen Subtypen (1-14) anhand der untersuchten IHC-Färbungen (S100A8⁺, S100A9⁺, CD15⁺) und dem HPV-Status sowie nochmals separat nach der Ausdehnung des Tumorstadiums mit Invasivität (pT1b-pT4) und Metastasierung (pN1-N3). Die Einteilung erfolgte in 4 verschiedene Färbungsprofile für Tumorgewebe und Immuninfiltrat der TMAs (Abb.14 Spalte 1-4) sowie nach dem Wachstum des Tumorgewebes (Abb.14 Zeile 1-3 Invasion, Zeile 4-5 Metastasierung)

Die Untersuchung wurde stufenweise durchgeführt für Proben mit positivem IRS für S100A8, S100A9 und doppelt positivem IRS. Zusätzliche Faktoren waren ein positiver IRS für CD15 als Marker für Neutrophileninfiltration und ein positiver HPV-Status. Stratifiziert wurden alle Proben nach dem histologischen Subtyp und als weiterer Faktor der Ausdehnung mit invasivem Wachstum (pT1b-pT4) und Metastasierung (\geq N1). Beginnend mit der Tumor-Auswertung für S100A8⁺, S100A9⁺ sowie doppelt positive Proben (Abb.14 Spalte 1) und folgend Proben die darüber hinaus einen positiven HPV-Status aufwiesen (Abb.14 Spalte 3). Die weitere Auswertung erfolgte für das Immuninfiltrat mit S100A8⁺CD15⁺, S100A9⁺CD15⁺ und dreifach positivem IHC-Scoring (Abb.14 Spalte 2) und unter Hinzunahme eines positiven HPV-Status (Abb.14 Spalte 4).

Im Vergleich zwischen den Subtypen zeigte sich, dass wie bereits vorher gezeigt überproportional mehr Metastasen bei den Patienten mit HPV-assoziierten Subtypen auftreten (11-14). Aber auch die nicht klassisch HPV-assoziierten Subtypen wie das am häufigsten diagnostizierte gewöhnliche SCC, zeigen in Teilen der Proben einen positiven HPV-Status, jedoch ohne signifikant häufigeres Auftreten von invasivem Wachstum oder Metastasierung im Vergleich zu den HPV-negativen Proben. Insgesamt zeigt sich ein kohärentes Expressionsmuster mit einer doppelt-, drei- und vierfachen Positivität des Markerprofils für alle untersuchten Proben des Tumorgewebes und Immuninfiltrats der Lymphknotenmetastasen. Erneut zeigt sich auch eine verstärkte Expression im Tumorzentrum im Vergleich zur Invasionsfront, sowohl des Tumorgewebes als auch des Immuninfiltrats. Insgesamt zeigte sich auch eine ausgeprägtere Immuninvasion in den Proben mit HPV-Nachweis beziehungsweise so auch den HPV-assoziierten Subtypen.

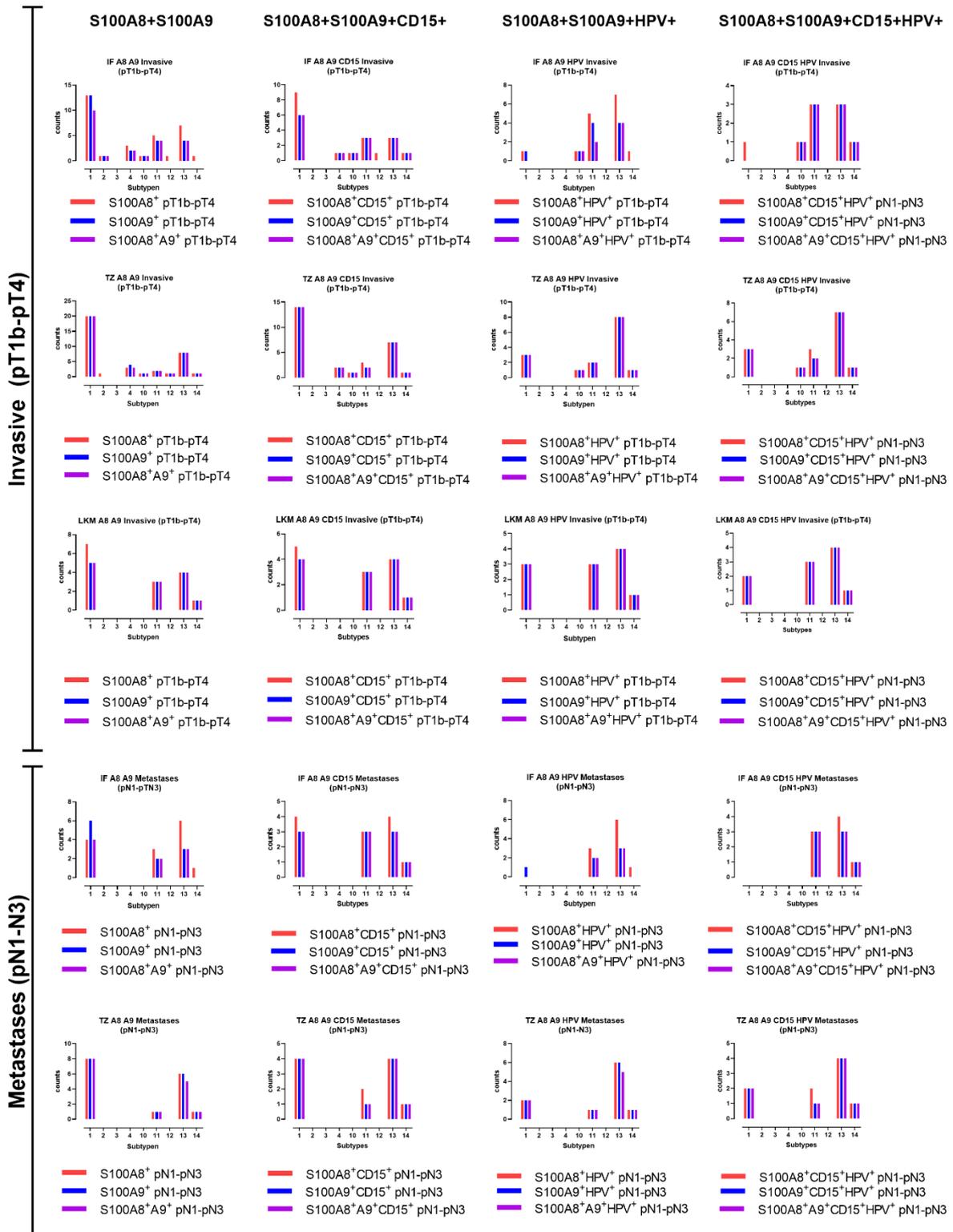


Abbildung 14 Einteilung der PeCa-Proben nach histopathologischem Subtyp und Ausdehnung nach TNM mit positivem IRS für S100A8, S100A9, CD15 und positivem HPV-Status:

Unterteilung der analysierten PeCa-Proben aus IF, TZ und LKM in die verschiedenen histopathologischen Subtypen (1-14) anhand der untersuchten IHC-Färbungen (S100A8, S100A9, CD15) und dem HPV-Status sowie nochmals separat nach der Ausdehnung des Tumorwachstums mit Invasivität (pT1b-pT4) und Metastasierung (pN1-pN3). Zuerst die alleinige Untersuchung von Proben

mit positivem IRS für S100A8, S100A9 oder Beidem (erste Spalte), sowie zusätzlichem positivem IRS für CD15 als Marker für Neutrophileninfiltration (zweite Spalte), HPV (dritte Spalte) oder Beidem (Spalte 4) stratifiziert nach dem histologischen Subtyp und Ausdehnung mit invasivem Wachstum (pT1b-pT4; Zeile 1-3) und Metastasierung (\geq N1; Zeile 4-5)

4.8 Assoziation des histologischen Grading mit den immunhistochemischen Biomarkern und dem HPV-Status

Das Grading nimmt durch seinen Einfluss auf das Tumorstadium seit der 8. Version der TNM-Klassifikation mit der sensiblen Unterteilung in eine invasive und eine nicht invasive Tumorentität (pT1a/b) hier ebenfalls einen relevanten Faktor ein. Die vorab präsentierten Übersichtsdaten des Patientenkollektivs mit Heatmaps zum Grading und der Subtypenverteilung im Gesamtkollektiv (Abb. 3) wurden hier nun zusätzlich bezogen auf die unterschiedlichen TNM-Tumorareale (IF, TZ, LKM) und dem etablierten Markerprofil (S100A8⁺, S100A9⁺, HPV⁺, CD15⁺, CD147⁺) korreliert.

Wie bei dem Eingangs unabhängig betrachteten Grading der Tumorproben zeigte sich auch hier eine schlechtere Differenzierung bei den HPV-assoziierten Subtypen. Tumore von Patienten, die Lymphknotenmetastasen aufwiesen zeigten eine schlechtere Differenzierung als jene, bei denen nur Proben aus dem Tumorzentrum oder der Invasionsfront vorlagen. Zwischen Proben aus dem Tumorzentrum und aus der Invasionsfront bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der Differenzierung. Abseits der Korrelation zwischen schlechterer Differenzierung und positivem HPV-Status zeigte sich kein signifikanter Einfluss der anderen Marker auf das Grading.

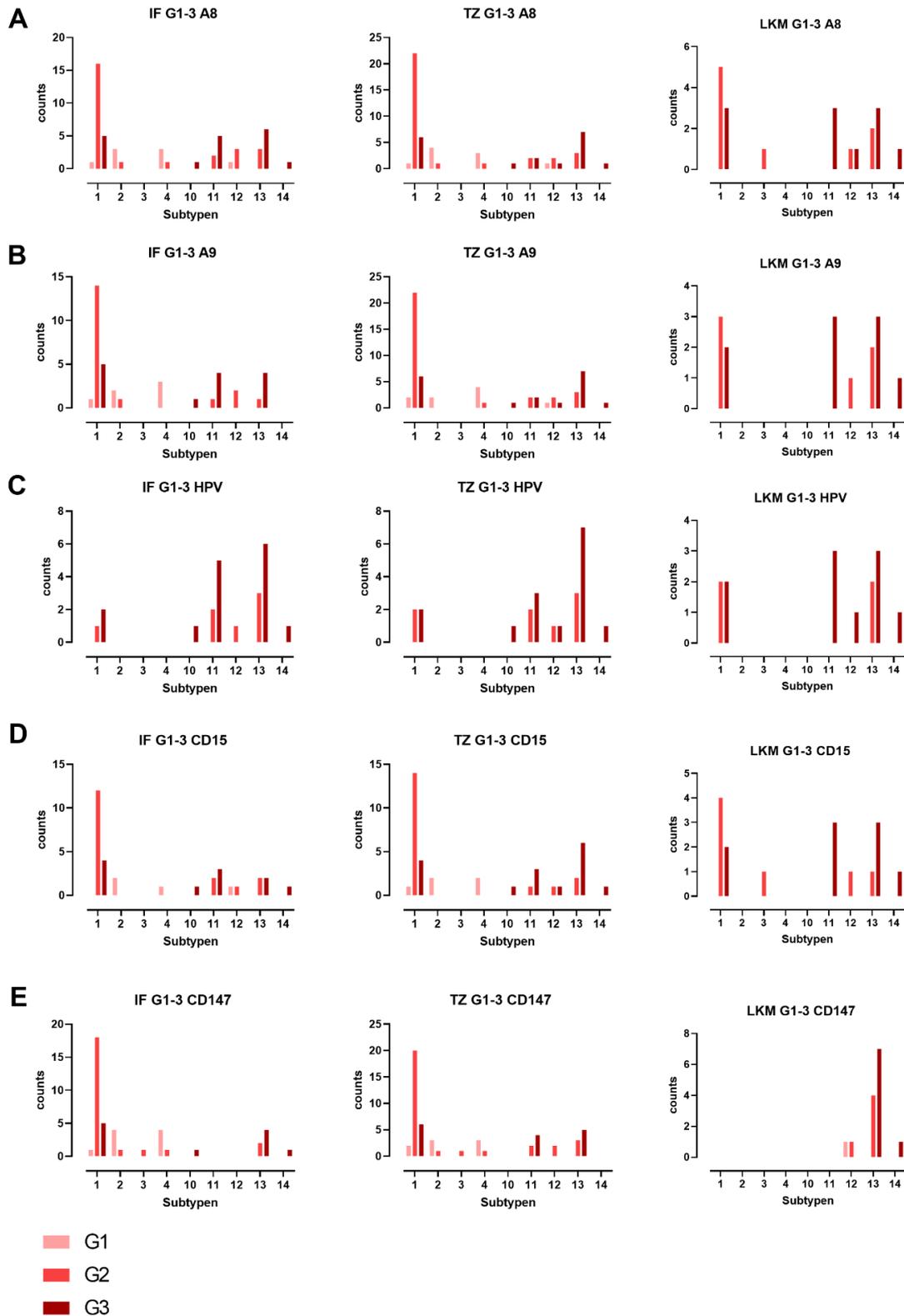


Abbildung 15 Grading der PeCa-Proben aufgeteilt nach Subtypen in Korrelation mit IHC-Färbeparametern (S100A8+, S100A9+, CD15+, CD147+) und HPV-Status:

Grading (G1-3) der Patientenproben aus den Tumorarealen (IF, TZ, LKM) aufgeteilt in die Subtypen (1-14) in Korrelation mit den immunhistochemischen Markern S100A8 (A), S100A9 (B), HPV (C), CD15 (D), CD147 (E).

5. Diskussion

Das penile Plattenepithel-Ca ist die häufigste maligne Tumorentität des männlichen Urogenitaltraktes, auch wenn diese in den westlichen Ländern insgesamt eine seltene Erkrankung darstellt. Wie bereits mit einfacher Extrapolation gezeigt, könnte auch in Deutschland eine steigende Inzidenzrate in den nächsten Jahren auftreten, während in mehreren Ländern Afrikas und Südamerikas bereits hohe altersstandardisierte Inzidenzraten (ASR) bekannt sind. Ein Grund hierfür könnten die zunehmende Prävalenz von HR-HPV-Infektionen der Schleimhäute mit konsekutiver Karzinogenese im Bereich des männlichen (Penis) sowie weiblichen Genitals (Vulva, Vagina, Cervix uteri), des Anus und im Kopf-Hals-Bereich (Mundboden, Oropharynx) sein.

Perspektivisch steigt so der Druck für weitere Fortschritte in der Grundlagenlagenforschung zur Genese dieser Tumorentitäten und molekularpathologischen Diagnostik um potenzielle diagnostische Marker, Risikoanalysen und mögliche Zielstrukturen für neue Therapieoptionen hervorzubringen. Bisher ist der alleinige Nachweis von p16 als Marker einer HPV-assoziierten Tumorerkrankung der einzige spezifischere Marker dieser Tumorentitäten und wird auch nicht überall regelhaft mitgetestet oder beeinflussend für die Therapieplanung und weitere Prognose gewertet. Für das Peniskarzinom existieren laut der aktuellen S3-Leitlinie (AWMF 2020) keinerlei etablierte Biomarker in der klinischen Routine und auch die gezielte antitumoröse Therapie steckt noch in den Anfängen.

Das hier gezeigte neuartige Markerprofil für das Tumorgewebe und das TME könnte hierbei ein erster Schritt für die Stratifizierung von PeCa Patienten hinsichtlich ihres Risikos für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen und einer aggressiveren Tumorerkrankung sein.

5.1 Probleme der Stadieneinteilung auf Grund der 8. TNM-Klassifikation

Seit der 8. TNM-Klassifikation der WHO von 2016 ist das Grading elementarer Bestandteil im Tumorstaging des Peniskarzinoms, damit ist es die einzige Tumorentität, bei der diese 2 Systeme kombiniert werden. Der Einfluss des Grading liegt in der Einteilung der pT1-Kategorie, beziehungsweise ihrer Einteilung in pT1a und pT1b. Hierbei sind eine Lymphgefäßinvasion (L1), eine perineurale Infiltration und eine schlechte Differenzierung (abhängig vom System G3 oder G4) als negative Einflussfaktoren zu werten, so dass ein

höheres Risiko für inguinale Lymphknotenmetastasen angenommen wird. Die Entscheidung bezüglich des Stadiums hat bedeutenden Einfluss auf die Invasivität der folgenden Therapie, was zum einen in einer Übertherapie oder aber in einer Untertherapie mit lokalen Rezidiven oder Lymphknotenmetastasen münden kann (AWMF 2020).

Da es sich bei dem Peniskarzinom auch unter der Berücksichtigung regionaler Unterschiede um eine statistisch eher seltene Tumorentität handelt und die Fälle in Deutschland nicht in einem Zentrum kumuliert werden, befundet auch ein erfahrener Pathologe durchschnittlich nur alle 17 Monate einen solchen Tumor (Erbersdobler 2018). Zudem fehlen einheitliche Grading-Kriterien und -Systeme, so existieren international verschiedene drei- bis vierstufige Einteilungssysteme basierend auf unterschiedlichen Bewertungskriterien. Grundsätzlich ist das Peniskarzinom, das zu 95% histologisch einem Plattenepithelkarzinom entspricht, durch die physiologische Differenzierung des Plattenepithels von der Basis zur Oberfläche gezeichnet. Auch in Tumoren kann diese Eigenschaft erhalten bleiben und das entstehende heterogene Muster schwieriger in der Bewertung sein als dies bei Adenokarzinomen der Fall ist (Erbersdobler 2018)

Zur bestmöglichen Auswertbarkeit sollte laut der aktuellen S3-Leitlinie die vollständige histologische Einbettung für pT1-Tumore erfolgen und ihre anschließende Befundung durch einen erfahrenen Uropathologen, wenn möglich an einem Behandlungszentrum, erfolgen. Die häufig durchgeführten primären Biopsien bei unklaren penilen Veränderungen oder Resektaten als intraoperativer Schnellschnitt sind durch die verwendete Gefrierschnitt-Technik nur eingeschränkt aussagekräftig bezüglich des Subtyps und dem Grading des Tumors (AWMF 2020). Die Präparate sollten zur Bewertung der Infiltrationstiefe und Schnittrandkontrolle abhängig vom Umfang der angewandten operativen Technik möglichst vollständig und eindeutig markiert eingeschendet werden. Lediglich bei Patienten mit einem hohen Risiko für Lymphknotenmetastasen ist eine intraoperative Schnellschnittuntersuchung sinnvoll, um den Lymphknotenstatus zu prüfen und gegebenenfalls eine modifizierte inguinale Lymphadenektomie durchzuführen (Algaba, Arce et al. 2005).

Weiter zeigen sich deutliche Unterschiede in der Interobserver-Variabilität in der Auswertung der histologischen Subtypen und der Bewertung des Gradings. In einer Untersuchung von Dorofte und Kollegen zeigte sich zwischen den 7 teilnehmenden Pathologen aus Italien und Schweden trotz des teilweise uropathologischen Fachschwerpunktes eine schlechte bis moderate Übereinstimmung in der Auswertung von 207 Patientenproben hinsichtlich der histologischen Subtypen (Fleiss' Kappa 0,02-0,48) und dem Grading (Fleiss' Kappa 0,07-0,55)

(Dorofte, Grelaud et al. 2021). In der Unterscheidung zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Subtypen war die Übereinstimmung schlecht bis gut (Fleiss' Kappa 0,02-0,79). Umgekehrt zeigte sich eine sehr gute Intraobserver-Variabilität für bei den histologischen Subtypen (Cohens' Kappa 0,94-0,91) und das Grading (Fleiss' Kappa 0,95-0,84) als die Proben erneut von den gleichen Untersuchern befundet wurden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Kakies und Kollegen die insgesamt 90 Patientenproben von 12 spezialisierten Uropathologen aus fünf europäischen Ländern hinsichtlich des Grading auswerten ließen (Kakies, Lopez-Beltran et al. 2014). Die Interobserver-Variabilität zeigte sich in dem vorgegebenen 4-stufigen Grading-Schema und den dazugehörigen diagnostischen Kriterien erneut schlecht bis moderat (Fleiss' Kappa von 0,02-0,67). Während die meisten eine Neigung zu eher moderaten (G2) Werten und der Meidung von Extremen (G4) zeigten, vergab eine Gruppe von Pathologen vermehrt ein gutes (G1) oder undifferenziertes (G4) Grading. Insbesondere die Unterscheidung zwischen guter bis moderater Differenzierung war für die meisten Pathologen schwierig. Währenddessen war die Intraobserver-Variabilität auch hier deutlich besser (Fleiss' Kappa von 0,60-0,65) (Kakies, Lopez-Beltran et al. 2014).

Insgesamt zeigt sich hier deutlich, weshalb die Integration des Tumorgradings in das TNM-Stadium zur Unterscheidung zwischen lokalen Tumoren mit geringem oder höheren Risiko (T1a/b) zu hinterfragen ist. Weiter sollte auch die aktuelle Risikobewertung anhand von rein statistisch in der Prognose besserer und schlechterer Subtypen kritisch bewertet werden. Der Mangel an standardisierten objektivierbaren morphologischen Grading-Kriterien und das individuelle Erfahrungslevel des befundenden Pathologen sind neben den tumoreigenen Eigenschaften, die die Bewertung erschweren können, für die schwankende Intra- und Interobserver-Variabilität verantwortlich. Der Druck zur Etablierung neuer multidimensionaler Methoden zur Risikostratifizierung, die sich neben histopathologischen Eigenschaften und klinischen Daten auch molekularpathologischer Methoden bedienen bleibt deshalb weiterhin hoch, um so in Zukunft mögliche Übertherapie mit verstümmelnden Operationen oder Untertherapie mit Lymphknotenmetastasen und Lokalrezidiven zu vermeiden. Auch für die Forschung mit retrospektiven Auswertungen von Patientendaten ist es essenziell, dass die vorhandenen Rohdaten repräsentativ und reproduzierbar sind, um verwertbare Aussagen über mögliche Zusammenhänge mit dem histopathologischen Subtyp und dem Grading zu treffen.

5.2 Analysen zur Risikostratifizierung – der aktuelle Stand

Damit eine moderne onkologische Therapie gewährleistet ist, sollten bei Diagnosestellung neben in Umfang und Invasivität adäquate Staging-Untersuchungen alle nötigen

Einflussparameter und Risikofaktoren bekannt sein. So kann dann eine möglichst auf den Patienten und die Prognose zugeschnittene Therapie eingeleitet werden.

Hilfreich bei der Entscheidungsfindung können hierbei Nomogramme und Assessments zur Risiko- und Prognoseberechnung sein, da diese verschiedene klinische, krankheitsspezifische und auch molekularpathologische Faktoren enthalten können. Um solche Modelle etablieren zu können, bedarf es einer Validierung an einer möglichst großen und repräsentativen Testpopulation, Unterscheidbarkeit von Patienten, bei denen ein spezifisches Ereignis auftritt und solchen ohne Ereignis, einer Kalibrierung zur Schätzung der Annäherung von angenommenem Risiko nach Nomogramm und beobachtetem Risiko sowie einem klinischen Nutzen bei der Entscheidungsfindung mit verbesserten Ergebnissen bei Therapieende (Balachandran, Gonen et al. 2015).

In einer retrospektiven Auswertung von Ficarra und Kollegen wurde ein Nomogramm zur Abschätzung des Risikos für das Auftreten von inguinalen Lymphknotenmetastasen anhand von klinischen Befunden (Phimose, Tumorlokalisierung am Penis, makroskopischem Wachstum, klinischem LK-Status) und verschiedenen pathologischen Faktoren der Primärtumoren (T-Stadium, Tumordicke, Grading, mikroskopischem Wachstumsmuster, Lymph-, Gefäßembolisation, lokaler Infiltration von Strukturen) untersucht (Ficarra, Zattoni et al. 2005, Ficarra, Zattoni et al. 2006). Hierbei konnte bei 87,6% der Patienten aus retrospektiver Betrachtungsweise das Auftreten von Lymphknotenmetastasen bei guter Kalibrierung vorhergesagt werden. Das Vorhandensein von palpatorisch vergrößerten inguinalen Lymphknoten und Tumorembolisation von lymphatischen und venösen Gefäßen waren hierbei die stärksten Prädiktoren (Ficarra, Zattoni et al. 2005). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Zhu und Kollegen, die ein Nomogramm zur Prädiktion von inguinalen LKM mit T-Stadium, Grading, lymphovaskulärer Infiltration und p53-Expression entwickelt haben. In der retrospektiven Auswertung zeigte sich hierbei allerdings nur die lymphovaskuläre Infiltration als unabhängiger prognostischer Wert in der Multivariantenanalyse. Insgesamt konnte Ihr Nomogramm theoretisch bei 1/100 Patienten eine positive Vorhersage treffen und bei 13/100 Patienten ein nicht notwendiges invasives Staging vermieden werden, ohne die Anzahl falsch-positiver Resultate zu erhöhen (Zhu, Zhang et al. 2010).

In einer weiteren Studie wurden 380 Fälle von Peniskarzinomen untersucht. 63 (17%) zeigten pathologisch bestätigte LKM. 35 (56%) davon wurden innerhalb von 3 Monaten nach der initialen Diagnose festgestellt. Diese Patienten zeigten eine schlechtere 5-Jahres Überlebensrate (43%) im Vergleich zu jenen bei denen erst im Verlauf durch eine Lymphknoten-Dissektion

LKM festgestellt wurden. Eine externe Validierung des Alters, des Tumorstadiums und dem Grading könnte laut dieser Studie dazu beitragen den Lymphknoten-Status vorherzusagen (Qu, Siemens et al. 2018).

Der Fokus auf Prädiktoren einer Lymphknotenmetastasierung ist hier auch sinnvoll, da der Lymphknotenstatus bis heute unabhängig vom Primärtumor einen eigenständigen und meist auch entscheidenden Prognosefaktor darstellt. Ohne offiziell anerkannte Nomogramme wird nach dem aktuellen Stand der S3-Leitlinie ein erhöhtes Risiko ab dem Tumorstadium pT1b, also schlechtem/undifferenziertem/sarkomatoidem Tumorgewebe (G3/4) oder lymphovaskulärer und/oder perineuraler Invasion definiert. Ab diesem Stadium sollten auch klinisch unauffällige, nicht tastbare inguinale Lymphknoten invasiv mittels dynamischer Sentinel-Lymphknotenbiopsie oder modifizierter inguinaler Lymphadenektomie untersucht werden. Fehlende Diagnostik und daraus resultierende Untertherapie kann hier zu einer deutlich kompromittierten Prognose führen, während eine Übertherapie im Sinne einer nicht notwendigen inguinale Lymphknoten-Dissektion mit einer signifikanten Morbidität und Komplikationsrate in bis zu 25% der Fälle verbunden ist (AWMF 2020).

Ein weiterer Aspekt der prognostischen Abschätzung und Risikokalkulation besteht im HPV-Status. Bei Oropharynx- und Vulva-Ca hat es sich bereits seit längerem etabliert, dass bei p16-positiven Tumoren verstärkt konservative Therapieoptionen wie eine Radiochemotherapie genutzt werden, da diese ein besseres Therapieansprechen zeigen (O'Rorke, Ellison et al. 2012, Hinten, Molijn et al. 2018). Eine mögliche Erklärung ist die erhöhte Immunogenität der Tumore durch virale Epitope mit in Folge weniger aggressiven Verläufen (Lont, Kroon et al. 2006). Die Datenlage für das Peniskarzinom ist dahingehend widersprüchlich, da es zwar einige Arbeiten gibt, die nach unterschiedlichen Ausgangspunkten ein besseres Outcome bei Patienten mit HPV-positiven Tumoren beschreiben, jedoch auch solche die diesen Effekt nicht zeigen konnten oder auf Limitierungen der Beobachtungen hinweisen (Sand, Rasmussen et al. 2018, Hölter, Khalmurzaev et al. 2019).

Exemplarisch konnte in der Metaanalyse zur prognostischen Signifikanz der p16^{INK4a}-Expression bei penilen SCCs von Zhang und Kollegen diese als unabhängiger prognostischer Faktor für das krebsspezifische Überleben (CSS) dargestellt werden. Limitierend wurden hier eingeschlossene Artikel mit nur quantitativer Schätzung, fehlender Einschluss asiatischer Studien sowie verschiedene cut-off Werte auf Grund der fehlenden Standardisierung gesehen. Trotzdem wurde hier auf ein signifikant höheres CSS bei positiver p16^{INK4a}-Expression verwiesen (Zhang, Zhang et al. 2018).

In der systematischen Review und Metaanalyse von Sand und Kollegen wurde der Zusammenhang zwischen HPV-DNA (12%-75%) und p16-Expression (28%-63%) mit dem krankheitsspezifischen Überleben (DSS) und Gesamtüberleben (OS) untersucht. Männer mit HPV-positiven PeCas hatten ein signifikant besseres DSS im Vergleich zu solchen mit HPV-negativen Tumoren. Gleiches zeigte sich für Männer mit p16-positiven Tumoren. Beide Variablen hatten jedoch keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Dies legt Parallelen zu Vulva- und Oropharynx-Ca nahe. Die Testung auf p16 und HPV-DNA sollte deshalb in der Routinediagnostik etabliert werden (Sand, Rasmussen et al. 2018). Zu dem gleichen Ergebnis kommt die retrospektive Analyse von Pereira-Lourenco und Kollegen. Diese zeigte ein besseres krankheitsspezifisches Überleben (DFS) und CSS bei Patienten mit positiver p16^{INK4a}-Überexpression (Pereira-Lourenco, Vieira et al. 2020).

Jedoch gilt es zu beachten, dass innerhalb der Gruppe der HPV-positiven wie auch der HPV-negative Tumore sowohl aggressivere (basaloides und sarkomatoides Karzinom) als auch Tumore mit besserer Prognose (warziges und verruköses Karzinom) existieren (Sanchez, Soares et al. 2015). Zu dieser Schlussfolgerung kommt auch die Untersuchung von Hölters und Kollegen, die TMAs des gleichen Kollektivs wie in dieser Arbeit hinsichtlich des HPV-Status (p16^{INK4a}-IHC + HPV-DNA-Genotypisierung), des histologischen Subtyps und verschiedener histopathologischer Eigenschaften (TNM, Grading, lymphovaskuläre, vaskuläre und perineurale Invasion) untersucht haben (Hölters, Khalmurzaev et al. 2019). Der HPV-Status war hier kein unabhängiger signifikanter Prognosefaktor für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen und das Überleben nach primär-definitiver chirurgischer Behandlung. Der histopathologische Subtyp war hingegen prognostisch signifikant und zeigte analog bereits vorpublizierter Daten (siehe Tabelle 2, beispielhaft adaptiert aus Informationen der EAU-Guideline (Hakenberg, Compérat et al. 2018)), dass die Prognose abhängig vom jeweiligen Subtyp ist und es so auch Patienten gibt die trotz HPV-positivem Tumor eine deutlich schlechtere Prognose haben als Patienten mit einem HPV-negativen Tumor. Dazu hatte das Auftreten von LKM und lymphovaskulärer Infiltration den ausgeprägtesten negativen Effekt auf das MFS (Metastasen-freies Überleben), CSS und OS. Auch konnte in ihrer Auswertung bei Gegenüberstellung der 7. und 8. Edition der TNM-Klassifikation kein prognostischer Mehrwert aus der neusten Version gezeigt werden (Hölters, Khalmurzaev et al. 2019).

In der diagnostischen Methodik und Datenerhebung gilt es weiterhin kritisch zu bewerten mit welchen Verfahren der HPV-Status bestimmt wurde und hinsichtlich der Prognose welche Subtypen wie häufig in der Testpopulation vertreten waren. Wie bereits zuvor beschrieben

sollte für eine höhere Aussagekraft der Daten eine möglichst heterogene Gruppe untersucht werden, um lokale HPV-Genotyp Prävalenzen und Patienteneigenschaften wie Alter, Herkunft, Ethnie und Risikoprofil zu berücksichtigen. Die sensitivste Methode zur Bestimmung des HPV-Status von Tumorgewebe ist die PCR-Amplifikation. Die Hinzunahme von p16^{INKa} als Surrogat-Marker liefert eine zusätzliche Sicherheit, jedoch ist hier bei einer Sensitivität von 100% die deutlich geringere Spezifität von nur 57% zu beachten (Steinestel, Al Ghazal et al. 2015). In einer systematischen Übersichtsarbeit und Metaanalyse von Olesen und Kollegen zeigten sich 79,6% der HPV-positiven und 18,5% der HPV-negativen Tumore positiv für p16^{INK4a} (Olesen, Sand et al. 2019). Neben unterschiedlichen cut-off Werten zur Determinierung einer p16^{INK4a} positiven Färbung könnte auch die „hit and run“-Hypothese bei solchen auf den ersten Blick nicht zusammenpassenden Ergebnissen eine Rolle spielen. Nach dieser Hypothese wird nach der Initiation der Tumorgenese durch HPV das Virus durch das Immunsystem eliminiert, der DNA-Nachweis gelingt hiernach nicht mehr und auch die p16^{INK4a}-Überexpression kann durch die mangelnde Bindung des Onkoprotein E7 an pRb fehlen.

Penile Plattenepithelkarzinome (SCC)	Gute Prognose	Intermediäre Prognose	Schlechte Prognose
Lokales Wachstum	Destruktiv	Destruktiv	Destruktiv
Tumor-assoziierte Mortalität	Sehr gering	Intermediär	Hoch
SCC-Varianten	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Verrukös ➤ Papillär ➤ Warzig ➤ Pseudohyperplastisches Carcinoma cuniculatum 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Gewöhnliches SCC ➤ Mischdifferenziert ➤ Warzig (pleomorphe Form) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Basaloid ➤ Sarkomatoid ➤ Adenosquamös

Tabelle 2 Prognose der verschiedenen Subtypen des penilen SCC:

Tabellarische Auflistung der plattenepithelialen Subtypen (SCC) nach lokalem Wachstumsverhalten und der Tumor-assoziierten Mortalität hinsichtlich der Prognose, adaptiert nach (Hakenberg, Compérat et al. 2018). Rot markiert die als HPV-assoziiert gewerteten Subtypen.

Analog hierzu wird in meiner retrospektiven Arbeit ein T-Stadium ab cT1b als „invasiv“ definiert und ein positiver Nodalstatus als „metastasiert“ gewertet. Aktuell werden weder in Deutschland noch international genormte Nomogramme oder diagnostische Profile abseits der oben genannten Differenzierung im T-Stadium zur Risikostratifizierung verwendet. Dazu muss das darin eingeschlossene Grading bei uneinheitlichen Grading-Systemen und Schwierigkeiten in der histopathologischen Befundung kritisch hinterfragt werden.

Die global zur externen Validierung verfügbaren Hilfsmittel zur Risikostratifizierung sind limitiert, besonders in der klinischen Routineversorgung. Hierbei wäre die Etablierung von Schwerpunktzentren hilfreich, um einerseits Patientendaten zentral zu erfassen und andererseits für Behandler und Pathologen eine fachliche Expertise zu erlangen. Insbesondere das Grading-System sollte vereinheitlicht werden, seine Integration in die TNM-Klassifikation jedoch weiter hinterfragt. Weiter sollte in jedem Stadium ein ungünstiges Grading und das Vorhandensein von (lympho)vaskulärer Infiltration als Risiko für eine Lymphknotenmetastasierung gewertet werden.

Die dargelegten Ergebnisse aus der Auswertung von S100A8/A9, CD15 und HPV-Status des Tumorgewebes und des Immuninfiltrats in den TMAs stimmen mit früheren Daten überein, die die Neutrophilen-Infiltration und einen positiven HPV-Status/HPV-assoziierten Subtyp (Abb. 11) mit schlecht differenzierten Tumoren (Abb. 15) invasiv wachsenden und früh metastasierten Tumorentitäten (Abb. 12, 14) in Verbindung bringen (Hölters, Khalmurzaev et al. 2019, Bernhard, Zwick et al. 2020). Dieses S100A8⁺S100A9⁺HPV⁺-Markerprofil, das mit CD15⁺ für das Immuninfiltrat erweitert werden kann könnte so ein Hinweis auf ein prognostisch nachteiliges TME sein mit einer höheren Rate an invasivem Wachstum und dem prognostisch wichtigen Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen bei Erstdiagnose.

Unter aktueller Ermangelung immunhistochemischer und molekularpathologischer Marker für ein Risikoprofil könnte in der näheren Zukunft auch eine höhere Gewichtung des histopathologischen Subtyps und des HPV-Status in der Diagnostik möglicherweise für die Radikalität und Eskalation von Therapien ausschlaggebend sein. Eine Standardisierung in der HPV-Diagnostik mit HPV-DNA Detektion sowie p16-Nachweis, sowie weiterführende Tests hinsichtlich der Integration der viralen Proteine in die DNA wären hier ein erster Schritt (Morgan, DiNardo et al. 2017). Dazu könnte das hier gezeigte IHC-Markerprofil für das Tumorgewebe und das Immuninfiltrat ebenfalls zu einer diagnostischen Risikobewertung beitragen oder neue therapeutische Zielstrukturen hervorbringen.

Immunhistochemische und molekularpathologische Marker bedürfen insgesamt weiterer intensiver Untersuchung an möglichst umfangreichen Patientenkollektive, um potenziell interessante Targets zu identifizieren. So könnte in Zukunft mit Hilfe von validierten Nomogrammen und einer Verfeinerung der bildgebenden Methoden eine möglichst patientenorientierte personalisierte Therapie angeboten werden, die unnötige invasive Diagnostik und Übertherapien vermeidet, gleichzeitig aber auch Patienten mit ungünstigem Risikoprofil erkennt.

5.3 TMAs - Ausschnitt eines komplexen Systems

Die Tissue-Microarray(TMA)-basierte Tumorbeprobung ermöglicht mit Multiplex-Assays eine Zeit-, Personal- und Material-effiziente Testung mehrerer hundert Proben zur gleichen Zeit. Bei der Untersuchung von Material eines einzelnen sowie mehrerer Patienten können so Gewebheterogenitätsprobleme erkannt und falsch-negative Diagnosen minimiert werden. Bereits aus kleinen Tumoren von beispielsweise $5 \times 5\text{mm}^2$ können 100 Gewebeslots gewonnen werden. Färbungen einzelner Gewebeproben mit einer Größe von 0,6-2mm sowie einer Dicke von 3-5 μm wären unter Berücksichtigung der Heterogenität des Tumorgewebes mit verschiedenen möglichen Subpopulationen, unterschiedlicher Immuninfiltration und Form des Gewebes nicht repräsentativ (DiVito, Charette et al. 2004, Li, Brewer et al. 2017). Deswegen sollten in der wissenschaftlichen Routine, wie auch in der vorliegenden Arbeit, Tumorproben in mehrere Teilabschnitte unterteilt und hieraus mehrfach beprobt werden, um falsch-negative Ergebnisse zu minimieren. Li und Kollegen haben in Ihrer Arbeit die Varianz in der Anzahl positiver Zellen innerhalb einzelner Gewebeslots untersucht und festgestellt, dass wenn die Anzahl der untersuchten Slots erhöht wird, die durchschnittliche Anzahl positiver Zellen sich der tatsächlichen Zahl in der gesamten Tumorprobe annähert (Li, Brewer et al. 2017).

Die Gewebekonservierung ist ein weiteres wichtiges Thema für die retrospektive wissenschaftliche Aufarbeitung. Im Gegensatz zur pathologischen Aufarbeitung aus frischem Material im Schnellschnitt unterliegt das Gewebe hierbei verschiedenen Einflüssen durch die Lagerung. Die Dauer der Lagerung, die Raumtemperatur und Art der Fixierung können antigene Eigenschaften des Gewebes modifizieren und so zu einer veränderten IHC-Färbung führen. Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe kann über viele Jahre eingelagert werden. Aus den Paraffin-Blöcken werden normalerweise zu färbende Schnittpräparate ein bis zwei Tage vor der Färbung herausgeschnitten. Da die Lagerung von Objektträgern weniger Platz einnimmt als die ursprünglichen Paraffin-Blöcke und diese zudem teilweise von Referenzzentren nur geliehen sind und zurückgeschickt werden müssen, lagern Institute somit

häufig fertig geschnittenes Gewebe. Ist dieses noch ungefärbt gilt eine nicht näher definierte Empfehlung diese zeitnah zu verwenden (Jacobs, E. et al. 1996, Bertheau, Cazals-Hatem et al. 1998).

Die Effekte von Umwelteinflüssen auf das Gewebe bei längerer Lagerung haben Jacobs und Kollegen in ihrer Studie zur IHC-Färbung von p53 in Brustkrebsgewebe evaluiert (Jacobs, E. et al. 1996). Hierbei zeigte sich ein erheblicher Verlust der p53-Reaktivität nach 12 Wochen Lagerung bei Raumtemperatur. Zum Teil wurden Proben, die zum Startzeitpunkt positiv waren, in dieser Zeit negativ und erzeugten so falsch-negative Ergebnisse in der IHC. Zudem zeigte sich ein signifikanter Verlust der Färbeintensität für Faktor VIII verwandte Antigene, ER-Protein und Bcl-2 nach einer Lagerung von 12 Wochen bei Raumtemperatur. Als Erklärung für die Veränderungen in der IHC-Färbung wurde neben der Raumtemperatur auch die Exposition des Gewebes gegenüber der Atmosphäre mit konsekutiver Oxidation und ausgeprägtere Antigenmaskierung diskutiert. Eine Paraffin Beschichtung des Gewebes zur Abschirmung des Gewebes gegenüber der umgebenden Luft konnte jedoch nicht zu einer signifikanten Reduktion des Verlustes der Immunreaktivität von p53 führen, hier wurde eine Lagerung in einer Vakuunkammer als effektivere Methode in Erwägung gezogen. In dieser Untersuchung blieb unklar, ob der Verlust der Immunreaktivität in gelagerten Objektträgern auf einen irreversiblen Antigenabbau oder auf eine reversible Maskierung von Antigenen oder Epitopen zurückzuführen ist, sofern eine geeignete Antigen-Wiedergewinnungsmethode angewendet wird. Es ist also möglich, dass aggressivere Antigen-Demaskierung notwendig ist, um eine optimale Färbung zu erreichen. Dabei gilt es zu beachten, dass eine übermäßige Exposition der Gewebeschnitte gegenüber Hitze oder proteolytischen Enzymen zu einer erhöhten Hintergrundfärbung und ausgedehnten Gewebedigestion führen kann, was die Interpretation der Färbung kompromittiert. Die Untersucher stellten auch die Hypothese auf, dass eine Lagerung bei 4°C in einem geringeren Maß zur Abnahme der p53-Immunoreaktivität führe. Eine vergleichende Untersuchung mit Probenduplikaten wurde nicht durchgeführt (Jacobs, E. et al. 1996).

Eine im Aufbau komplexere Arbeit von Bertheau und Kollegen verglich Färbungen alter Schnittpräparaten, mit der von frisch aus dem Paraffinblock geschnittenen Proben (Bertheau, Cazals-Hatem et al. 1998). Insgesamt wurden 11 Antikörper (Zytokeratin, EMA, Vimentin, Smooth Muscle Actin, PS100, Chromogranin, CD45, CD20, CD3, CD30, OR) an 3 Tumorentitäten (Mamma-Ca, Lymphome, neuroendokrine Karzinome) mit unterschiedlicher Lagerungszeit von 3 bis 10 Jahren getestet. Für 3 Antikörper wurden zusätzlich 3 und 12 Monate

alte Proben genutzt. Als Referenz dienten Proben, die eine Woche zuvor frisch aus dem Paraffinblock geschnitten wurden. Signifikante Unterschiede zeigten sich bei 4 Färbungen, mit Verlust der Färbeintensität nach 3 Monaten (Chromogranin, OR) oder erst nach mehreren Jahren (CD3), vermehrter Hintergrundfärbung (CD3) und einer verstärkten Färbung (Vimetin). Auf Grund der unterschiedlichen Veränderungen gingen die Autoren eher von einer Antigenalteration als einem Antigenverlust über die Zeit aus. Die Antikörperbindung wird erschwert oder sie binden an andere Zielstrukturen, was die Färbungen verfälscht. Möglicherweise könnte hier auch eine verstärkte Antigendemaskierung die Proben erneut aufbereiten. Abschließend werden die beobachteten Phänomene nicht als Problem in der täglichen Routine in Pathologien gesehen, da Schnitte hier nicht älter als ein oder zwei Tage sind. Jedoch könnten sich so retrospektiv heterogene Ergebnisse in Studien erklären. Die Autoren empfehlen ebenfalls keine Aufbewahrung von bereits fertigen Objektträgern über 3 Monate hinaus (Bertheau, Cazals-Hatem et al. 1998).

Weitere Arbeiten wie DiVito und Kollegen untersuchten Methoden zur Verbesserung der Lagerungsbedingungen und Reduktion des Oxidationseffekt auf das Gewebe (DiVito, Charette et al. 2004). Aus dieser Arbeit mit 200 Primärentumoren mit jeweils 100 Proben mit positivem und negativen Nodalstatus und 2 Antikörper-Färbungen schlossen Sie, dass eine Paraffin-Ummantelung und Lagerung in Stickstoff-Exsikkatoren die Gewebe-Antigenität bis zu 3 Monaten ohne Verlust oder Alteration erhalten könne (DiVito, Charette et al. 2004). Forse und Kollegen untersuchte an Mamma-Ca Proben die Färbeintensität und das Expressionsmuster von 4 Zielstrukturen sowie der Ki67 Färbeintensität von im Durchschnitt 12,8 Jahren alten Schnitten bei Lagerung bei -80°C im Vergleich zu frischen Schnitten derselben Tumoren (Forse, Pinnaduwege et al. 2019). Hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der untersuchten Färbungen zwischen den beiden Gruppen. Analog bereits veröffentlichter Publikationen bei vermutetem Verlust der Antigenität und Epitop-Instabilität von ungefärbten Schnitten bei Raumtemperatur wird eine Lagerung zwischen 4 - -20°C empfohlen. Auch hinsichtlich der Umsetzbarkeit und Kosten Effektivität erscheint dies realistischer als eine Lagerung über Jahre bei -80°C (Forse, Pinnaduwege et al. 2019). Blows und Kollegen verglichen in ihrer Studie drei Fixationstechniken für TMAs (3 µm Dicke auf Glasträgern): Färbung direkt nach dem Schneiden, Färbung nach einem Jahr mit Wachsüberzug unmittelbar nach dem Schneiden und Färbung nach einem Jahr (Blows, Ali et al. 2016). Getestet wurden die Schnitte für IHC-Färbungen für Progesteronrezeptoren, als robuster und erprobter Antikörper in der Routine, und MK167 als weniger stabiler Antikörper. Die Progesteronrezeptor-Färbung zeigte sich stabil in den Testungen von frischen zu gelagerten

Schnitten, während sich für MK167 ein statistisch signifikanten Unterschied zeigte. Die Waxummantelung erbrachte hierbei nur einen geringfügigen Unterschied. Multivariate Cox-Regressionsanalysen der Überlebenszeit zeigten keine Verbesserung zwischen den Modellen mit adjustierter Schwächung und solchen ohne, der Grund hierfür war eine Abnahme der Antigenität für alle IHC-Subtypen. Limitierend in der Studie war jedoch der Beobachtungszeitraum für ein Jahr. Die Biomarker Antigenität zeigt eine zwar statistisch signifikante, jedoch insgesamt geringe Abschwächung der Antigenität über eine mittelfristige Lagerungszeit (Blows, Ali et al. 2016).

Das gesamte Spektrum an Antigenen und Geweben, bei denen solche lagerungsbedingten Probleme potenziell auftreten können sind nicht abschätzbar. Die beschriebenen Phänomene der Antigenmodifikation oder sogar des Antigenverlustes bei längerer Lagerung sollten in der histopathologischen Routinediagnostik keine große Rolle spielen sollten, da die durchgeführten IHC-Färbungen typischerweise nur Stunden bis Tage nach dem Schneiden des Paraffinblocks und dem Spannen auf den Objektträgern durchgeführt wird. Der Hauptaugenmerk liegt dabei in der häufigen Verwendung von eingelagerten Objektträgern in der Forschung. Angesichts der dargestellten und in Teilen widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich der Alterationen über Zeit und gewisse Lagerungsbedingungen sollte hier möglichst eine breit verfügbare wissenschaftliche Routine im Umgang mit Gewebe eingeführt werden. So sollten mit einer neuen Probenserie immer Positiv- und Negativ-Kontrollen bekannten und gleichbleibenden Standards gefärbt werden, um insbesondere bei neu etablierten Färbungen, eine durchgehende Qualität zu sichern. Die retrospektive Untersuchung von Gewebe, insbesondere in Form von TMAs, ermöglichen die gleichzeitige immunhistochemische oder auch Fluoreszenz in situ Hybridisierung von mehreren hundert Proben. Als Schnittstelle zwischen klinischer Tätigkeit und Forschung können neue potenzielle klinische Zielstrukturen untersucht und mit bereits vorhandenen Patientendaten korreliert werden. Hierzu sollte der Untersucher, der meist kein ausgebildeter Pathologe ist, vertraut mit den Eigenschaften der verwendeten Antikörper, möglichen Kreuzreaktivitäten und Antigenlokalisation auf und in der Zelle sein. Die spezifischen Eigenschaften der zu untersuchenden Gewebe sollten bekannt sein und im Falle von Tumorgewebe, dieses klar vom Normalgewebe während der Untersuchung unterschieden werden können. So sollten methodische Limitationen und cut-off Level korrekt interpretiert und falsch-positive Färbungen erkannt werden (Kononen, Bubendorf et al. 1998, Hoos and Cordon-Cardo 2001, Leong 2004)

5.4 Beschränkungen des Kollektivs

Neben möglichen Problemen mit Epitop-Alterationen oder -Verlusten durch längere Lagerungszeiten der Proben in dem Erhebungszeitraum von über zwei Jahrzehnten und nicht auszuschließenden wechselnden Lagerungsbedingungen vor und nach Fixation gibt es auch weitere Faktoren, die Einfluss auf die Ergebnisse in diesem Kollektiv haben könnten. So beschränkt sich diese Untersuchung hier nur auf Proben aus Deutschland und Russland, wobei repräsentativ analog zur jeweiligen Bevölkerung von einem im Querschnitt kaukasischen Phänotyp ausgegangen werden muss. Global gesehen variiert jedoch zwischen den verschiedenen Ländern und Ethnien der Anteil HPV-positiver Tumore und HPV-Typen sowie hiermit verbunden auch den Subtypen.

Mit insgesamt 74 eingeschlossenen Patienten und Proben aus mehreren Tumorarealen sowie auch anhängenden Normalgeweben liegt für die seltene Tumorentität des Peniskarzinoms eine im Vergleich zur Fachliteratur bereits größere Patientenanzahl vor. Insgesamt 9 verschiedene Subtypen wurden im untersuchten Kollektiv eingeschlossen. Zur besseren Veranschaulichung der Subtypenverteilung (Abb. 16A) und HPV-Positivität (Abb. 16B) des untersuchten Kollektivs erfolgt der Vergleich zwischen den bereits publizierten Daten dieses Kollektivs mit der systematischen Übersicht von Miralles-Guri und Kollegen mit 1466 Patienten aus 14 Ländern von 4 Kontinenten (Miralles-Guri, Bruni et al. 2009, Mohr, Zwick et al. 2022). Hier wurden ebenfalls insgesamt 9 verschiedene Subtypen untersucht, jedoch nicht in der gleichen Zusammensetzung wie in diesem Kollektiv (Miralles-Guri, Bruni et al. 2009). Das zur Untersuchung verwendete Material der 31 eingeschlossenen Studien wurde unterschiedlich konserviert mit Einbettung in Paraffin (PE) oder Paraffinwachs (PWE), Formalin-fixiert und mit anschließender Paraffinwachs-Einbettung (FFPE) sowie in Teilen frisch oder eingefroren zur Untersuchung verwendet. Der HPV-Status wurde bis auf eine Studie, die einen Southern Blot nutzte mittels HPV-DNA PCR (meist MY09/11, GP5+/6+ Primern und Typenspezifischen Proben von HPV16/18) festgelegt. Signifikante Unterschiede in der HPV-DNA-Detektion zwischen Southern Blot und PCR und sowie verschiedenen Techniken der Gewebefixation (Paraffin oder fresh frozen tissue) wurde nicht festgestellt. Die am häufigsten festgestellten HPV-Typen waren hierbei HPV 16 (60,23%), HPV 18 (13,35%) und HPV 6/11 (8,13%) (Miralles-Guri, Bruni et al. 2009).

In die Übersicht (Abb. 16) eingeschlossen wurden nur jene Subtypen, die in beiden Untersuchungen klar und gleichsinnig gekennzeichnet wurden. Es zeigt sich ein höherer Anteil der HPV-assoziierten Subtypen (warzig-basaloides, warziges, basaloides Karzinom) in meinem

Kollektiv, während im Gesamtkollektiv der Probenanteil mit positivem HPV-Nachweis mit 39,1% (29/74) kleiner als in der systematischen Review mit 46,99% (689/1466) ist. Jedoch wurde hier zusätzlich eine adaptierte HPV-Prävalenz nach Gewichtung der globalen Subtypen-Verteilung peniler Malignome vorgenommen, wonach ein prozentualer Anteil von 38,9% vorliegen würde und so nahezu identisch mit der von mir untersuchten Population wäre. Ein Unterschied zeigt sich in den nachgewiesenen HPV-Typen, hier dominiert in dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv HPV 16 mit 93,1% und HPV 18 mit 3,45%. Dies lässt sich durch das gehäufte Auftreten von Mischinfektionen in der systematischen Review erklären, während in meinem Kollektiv ausschließlich Monoinfektionen nachgewiesen werden konnten. Ein weiterer aktuell noch wenig erforschter Punkt ist der Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität für HPV-Infektionen und dem penilen Mikrobiom sowie die Interaktion bei manifester Infektion (Onywera, Williamson et al. 2020).

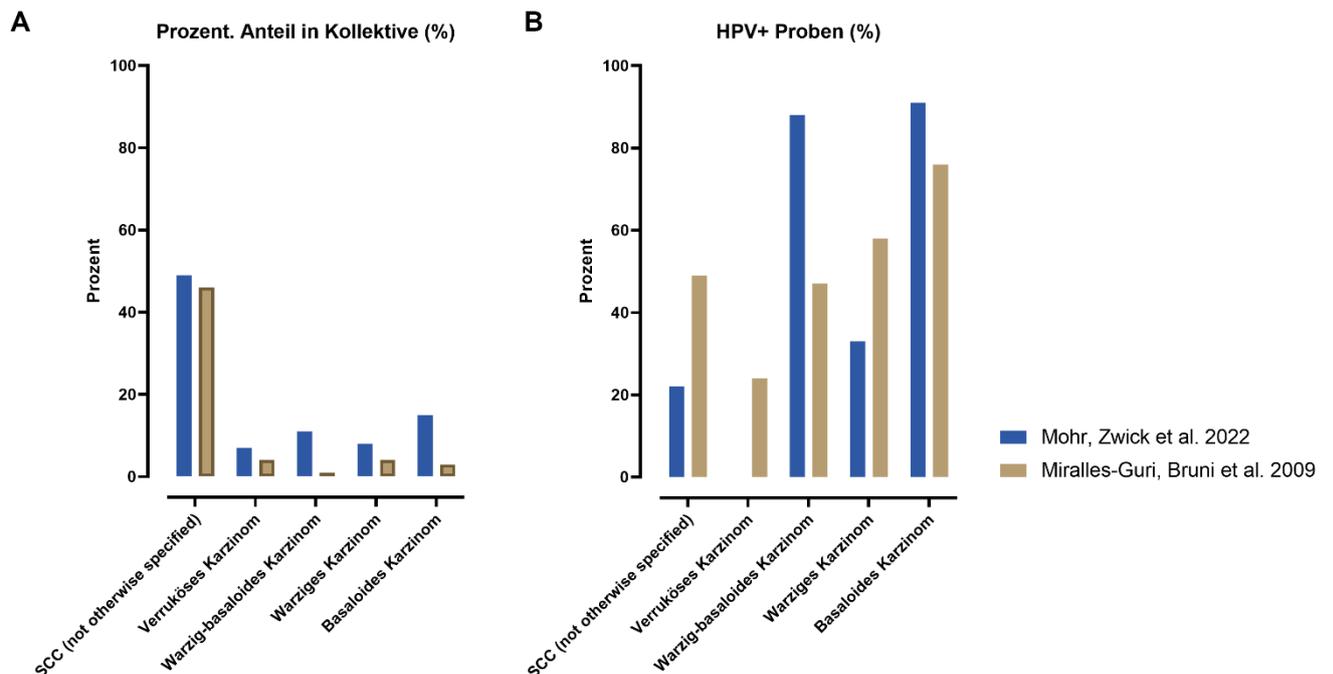


Abbildung 16 Vergleich der Subtypenverteilung und des HPV-Status:

A) Darstellung der prozentualen Subtypen-Verteilung in beiden Kollektiven. B) Prozentualer Anteil HPV-positiver Proben in den jeweiligen Subtypen. Adaptiert nach Daten von (Miralles-Guri, Bruni et al. 2009)

Weitere Gründe für Diskrepanzen bei HPV-Nachweis und der folgenden Genotypisierung sind häufig retrospektiv mit unterschiedlich sensitiven Nachweismethoden zu erklären und darüber hinaus auch unter Berücksichtigung lokaler Unterschiede in der HPV-Prävalenz zu interpretieren. In der Studie von Senba und Kollegen wurden insgesamt 88 penile Proben (65

maligne, 1 prämaligene, 22 benigne) aus dem nördlichen Thailand untersucht (Senba, Kumatori et al. 2006). Hierbei zeigte sich zum einen eine unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Diagnostik zwischen Situ Hybridisierung (ISH) und PCR zur Detektion von HPV-DNA von 53,8% (ISH) gegenüber 81,5% (PCR). Zum anderen wurde eine insgesamt hohe HPV-Prävalenz mit den vorrangig auftretenden Typen HPV18 (55,4%) und HPV6 (43,1%) als Mono- oder Mischinfektion detektiert. Die insgesamt hohe HPV-Prävalenz sowie der hohe Anteil von LR-HPV-Typen (HPV 6) könnte durch den Einschluss von benignen Läsionen erklärt werden, die in der Literatur mit einer hohen HPV-Positivität von Dysplasien (90%) und Kondylomen (100%) beschrieben werden (Rubin, Kleter et al. 2001). Der häufige Nachweis von HPV18 gegenüber dem sonst üblich dominierenden Typ HPV16 könnte dann hierbei tatsächlich als regionale Besonderheit interpretiert werden (Senba, Kumatori et al. 2006).

5.5 Potenzieller Einfluss der untersuchten und etablierten Biomarker auf den Tumor und das Immuninfiltrat innerhalb des TME

Die moderne onkologische Therapie stützt sich neben Chirurgie, Bestrahlung und zytostatischer Therapie auf neue gezielte Therapeutika wie Antikörper, Checkpoint-Inhibitoren und weitere zielgerichtete Medikamente die unter anderem auch modulierend auf das TME wirken. Als Grundlage dienen histopathologische und molekularpathologische Untersuchungen wie die Bestimmung des PD-L1-Status, Mikrosatelliten-Instabilitäten und möglichen Mutationen in Schlüsselgenen.

Da die Datenlage zu molekularpathologischen Biomarkern sowie daraus hervorgehende klinische Studien zur zielgerichteten Therapie des Peniskarzinoms weiterhin sehr spärlich ist, steigt auf Grund der bislang sehr schlechten Prognose die Notwendigkeit für verlässliche Marker bei Patienten mit Risikofaktoren eines ungünstigen Krankheitsverlaufs beziehungsweise bereits eingetretener Metastasen. Da in der aktuellen S3-Leitlinie keine molekularbiologischen Marker empfohlen werden (AWMF 2020), kann man sich hier bislang nur an bereits in anderen Entitäten und beim Peniskarzinom in einzelnen Studien beschriebene Marker orientieren.

Sand und Kollegen werteten in ihrer Metaanalyse Peniskarzinom-Proben anhand von HPV-DNA Nachweis und einer positiven p16-Expression für das DSS, DFS und OS aus. Hierbei zeigte sich sowohl bei Männern mit HPV-DNA-Nachweis als auch bei positiver p16-Expression, ein statistisch signifikant verbessertes DSS (HR_{HPV} DSS 0.61 [95% (CI), 0,38–0,98], HR_{p16} DSS 0.45 [95%(CI), 0,30–0,69]) (Sand, Rasmussen et al. 2018). Zu einem

ähnlichen Ergebnis kamen auch Zhang und Kollegen in ihrer Metaanalyse, in der sich ein erhöhtes CSS bei Patienten mit positiver p16-Expression zeigte (HR=0,45, [95%(CI): 0,30-0,67], P<0.001) (Zhang, Zhang et al. 2018).

Der zweite wichtige Weg der Onkogenese, unabhängig einer vorangegangenen oder aktiven HPV-Infektion, sind Alterationen des Tumorsuppressors p53. In einer Multivarienzanalyse konnte bei guter Interobserver-Reproduzierbarkeit der p53-Färbung an Proben von primär chirurgisch behandelten PeCa-Patienten ein verbessertes 5-Jahres CSS bei p-53 negativen Patienten (84% vs 51%, p=0,003) gezeigt werden. Weiter war p53 hier ein unabhängiger statistisch signifikanter Prognosefaktor für das CSS (HR=3,20 p=0,041) (Gunia, Kakies et al. 2012). In der Arbeit von Lopez und Kollegen konnte p53 (Positivität ab 20% der Zellkerne p=0,012; Grading 1 (20-50%)/Grading 2 (>50%) p=0,004) als statistisch signifikanter Faktor (RR=4,8, [95%(CI), 1,60 –14,90]) neben lymphovaskulärer Embolisation für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. Patienten ohne Nachweis einer erhöhten p53-Wildtyp Expression zeigten ein signifikant verbessertes 5- und 10-Jahres OS gegenüber solchen mit positiver Färbung (64,5%/54,6% vs. 30,2%/26,4%, p=0,009). Bei gleichzeitigem Auftreten von positivem p53 und HPV-DNA-Nachweis verschlechterte sich die Prognose (Lopes, Bezarra et al. 2002). Zu gleichartigen Ergebnissen kamen auch Zhou und Kollegen., die p53 neben Tumorembolisation ebenso als unabhängigen prognostischen Faktor für Metastasen ermittelt haben. Bei Patienten mit einem sehr frühen Stadium (pT1) war eine erhöhte Expression von p53 (>20% der Zellkerne) mit einer signifikant schlechteren Prognose und dem Auftreten von Metastasen im Verlauf assoziiert (Zhu, Zhou et al. 2007).

Die Ki67-Expression definiert als nukleäres Protein der G2/M-Phase des Zellzyklus die Proliferationsrate von Malignomen und zeigte sich in Tumoren mit positivem Nodalstatus (p=0,005) und Fernmetastasen (p=0,026) signifikant höher als in solchen ohne lymphatische oder organische Metastasen. Die HPV-assoziierten Subtypen zeigten hierbei eine starke (basaloider Subtyp) und intermediäre Expression (verruköser Subtyp). Bei diesen Subtypen zeigte sich auch eine statistisch signifikante Assoziation zwischen positivem HPV-Status und einer erhöhten Ki67-Expression (p=0,009) (Protzel, Knoedel et al. 2007).

Eine epigenetische Untersuchung von Feber und Kollegen zu variablen Methylierungs-Positionen (MVPs) unter Einschluss hypermethylierter Regionen, die für Tumorsuppressorgene kodieren, zeigte beim Peniskarzinom eine spezifische Episignatur von 4 Genen die retrospektiv mit Lymphknotenmetastasen assoziiert waren (Feber, Arya et al. 2015). Ebenso erfolgte eine epigenetische Untersuchung von HPV-positiven Proben, hier wurde ein aus 30 Loci

bestehendes Profil erstellt, das den HPV-Status sicher bestimmen und bei unabhängigen HNSCC (Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma)/CeSCC (Cervical Squamous Cell Carcinoma)-Proben aus einer Datenbank das Überleben prädiktieren soll. Bei ausschließlich HPV16-assoziierten Proben in der Kohorte zeigte sich ein prädominant hypometyliertes Muster, was beim Peniskarzinom erstmals die bereits aus HNSCC und Cervix bekannten epigenetischen Veränderung der Wirtszelle während der malignen Transformation beschreibt. Patienten mit einer solchen negativen Signatur zeigten ein signifikant schlechteres OS (Feber, Arya et al. 2015). Eine Untersuchung von Alves und Kollegen zu genetischen Aberrationen anhand von Kopienzahlvariationen (CNA) bei Peniskarzinomen zeigte eine Reihe an Duplikationen und Deletionen in verschiedenen Autosomen sowie dem X-Chromosom. Nach Unterteilung in 3 Gruppen in Abhängigkeit von der Höhe der CNA zeigte sich eine Tendenz zu einem verbesserten medianen Überleben bei höherer CNA (Alves, Heller et al. 2001). Ein weiterer Ansatz sind Untersuchungen des MYC Protoonkogens, das als Transkriptionsfaktor Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflusst. In der Arbeit von Masferrer und Kollegen konnte gezeigt werden, dass bei der Onkogenese von einem penilen Carcinoma in situ zu einem metastasierten invasiven Karzinom die MYC-Amplifikation zunehmend ansteigt (Masferrer, Ferrandiz-Pulido et al. 2012). Die MYC-Expression war hier ein auch vom HPV-Status unabhängiger Faktor für eine schlechte Prognose. Trotzdem konnte in HPV-positiven Proben eine erhöhte MYC-Expression im Vergleich zu negativen Tumoren aufgezeigt werden, was für eine direkte MYC-Aktivierung in der Onkogenese sprechen kann (Masferrer, Ferrandiz-Pulido et al. 2012).

Nun sollten jedoch neben diesen tumorzellspezifischen Biomarkern auch jene berücksichtigt werden, die im komplexen Zusammenspiel von Tumor, umliegenden Bystander-Zellen des TME und infiltrierenden Immunzellen eine Rolle spielen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Marker Calprotectin (S100A8/A9) und EMMPRIN (CD147) zeigten sich im Vergleich zu Normalgewebe deutlich erhöht, insbesondere in Proben des Tumorzentrums sowie allen Lymphknotenmetastasen. In Arbeiten zu Carcinoma in situ und invasiven Tumoren der Kopf-Hals-Region, der Haut sowie der Cervix konnten bereits Calprotectin-Dysregulationen beschrieben werden. Dabei zeigte sich auch ein Zusammenhang zu der HPV-abhängigen malignen Transformation mit Calprotectin als möglicher früher Einflussfaktor in der Karzinogenese verschiedener Lokalisationen (Khammanivong, Sorenson et al. 2016, Podgorska, Oldak et al. 2018, Strickley, Messerschmidt et al. 2019)

Argiris und Kollegen zeigten in HNSCC die Eigenschaft von S100A8/S100A9 die Tumordifferenzierung zu regulieren, Zellzyklus-Checkpoints wiederherzustellen sowie die Inhibierung von Invasion und Migration. Ein Verlust der Calprotectin-Expression wiederum war mit einer Hochregulation von negativ prognostischem EGFR, Transformation von Präkanzerosen zu invasiven Tumoren, Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung und insgesamt einer schlechteren Überlebensrate assoziiert. Eine Wiederherstellung der endogenen Level von S100A8/A9 in dysplastischen Zellen könnte laut den Autoren so ein therapeutisches Target darstellen (Argiris, Slama et al. 2018). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Khammanivong und Kollegen, die in S100A8/A9 eine Schlüsselrolle in Zellzyklusregulation und chronischer Inflammation sowie eine potenzielle Beteiligung in der Differenzierung bei HNSCC sehen. In ihrer Untersuchung war eine reduzierte Expression mit gesteigerter DNA-Methylierung, geringer differenzierten Tumoren sowie reduziertem OS assoziiert (Khammanivong, Sorenson et al. 2016). Podgorska und Kollegen befassten sich mit der Rolle von S100A8/A9 im Rahmen chronischer Inflammationen der Haut und Wachstumsförderung von Hauttumoren (Podgorska, Oldak et al. 2018). Patienten die unter Epidermodysplasia verruciformis (EV), einer Genodermatose mit chronischer HPV-Infektion, litten zeigten eine Infiltration von CD15⁺ Granulozyten und eine deutlich erhöhte S100-Expression in der suprabasalen Schicht der Epidermis. Die viralen Onkoproteine E6/E7 waren hier in der Suppression der physiologischen S100-Expression im Rahmen der Zelldifferenzierung involviert, während E2 zu einer Hochregulation führte. Die nicht physiologische Hochregulation von S100-Proteinen durch E2 könnte Entzündungen und Tumorprogression fördern. Diese Interaktion von E2 mit S100A8/A9 könnte erklären, warum bestimmte HPV-Typen, wie hier an HPV8 untersucht, mit der Entstehung von Hautkrebs assoziiert sind (Podgorska, Oldak et al. 2018). Strickley und Kollegen konnten eine Induktion von S100-Genen und eine erhöhte Expression bei SCC der Haut und Warzen im Vergleich zu gesunder Haut und seborrhoischen Keratosen nachweisen. In letzteren wird S100A8/A9 sogar herunterreguliert (Strickley, Messerschmidt et al. 2019). Zhu und Kollegen konnten auch im Bereich der Cervix eine Überexpression von S100A9 in Präkanzerosen (CIN) und invasiven SCC der Cervix nachweisen. S100A9 und RAGE als Ligand zeigten sich signifikant höher in gut differenzierten Tumoren als in solchen mit geringer Differenzierung (Zhu, Lv et al. 2009, Zhu, Jin et al. 2013).

In meiner Arbeit zeigt sich neben der Expression von S100A8/S100A9 durch die Tumorzellen selbst auch eine Färbung der einwandernden Neutrophilen, die zusätzlich mittels einer CD15-Kofärbung markiert wurden. Zur besseren Veranschaulichung des komplexen Zusammenspiels

der hier untersuchten Biomarker und des Modells der CXCL8-Calprotectin-CD147-Neutrophilen-Achse dient die bereits vorpublizierte Abbildung (Abb. 17) (Mohr, Zwick et al. 2022). Unabhängig vom HPV-Status werden im TME durch den Einfluss von Tumor- und Stromazellen myeloische Zellen mittels spezifischer Chemokine und Zytokine wie Calprotectin und CXCL8 rekrutiert (Abb. 17.1) (Bernhard, Zwick et al. 2020). Sind diese Immunzellen erst einmal im TME angekommen werden sie zu TAN und MDSC umprogrammiert (Abb. 17.2), die über eine positive Rückkopplung autokrin Calprotectin synthetisieren (Abb. 17.3), sowie eine immunsuppressive Wirkung zeigen und protumoröse Eigenschaften wie Angiogenese, Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, Umbau der EZM durch MMP vermitteln (Abb. 17.4). Si und Kollegen zeigten in ihrer Arbeit ein schlechteres Überleben bei primär operierten HNSCC-Patienten, bei denen intratumoral und im TME PMN(polymorphnukleäre)-MDSC (LOX1⁺ CD66b⁺) nachgewiesen werden konnten (Si, Merz et al. 2019). Diese herunterregulieren, insbesondere im Tumorzentrum, die wichtigen antitumorösen Aktivitäten der T-Zellen. Ähnliche Ergebnisse präsentierten auch Ottenhof und Kollegen in ihrer Arbeit zum TME bei penilen SCC, in der LKM mit hoher intratumoraler CD163⁺ Makrophagen-Infiltration und geringer Zahl an stromalen CD8⁺ T-Zellen verbunden waren (Ottenhof, Djajadiningrat et al. 2018). Durch das protumoröse Milieu mit Protektion gegenüber der Überwachung des Immunsystems und Versorgung mit Nährstoffen und Wachstumsmediatoren können Tumore wachsen (Abb. 17.6). Ein Umbau der umliegenden EZM durch CD147-induzierte Matrixmetalloproteasen und verschiedene tumorassoziierte Faktoren wie TNF- α , VEGF und TGF- β induziertes Calprotectin ermöglichen Präkanzerosen ein invasives Wachstum zu erlangen und nach der EMT und Schaffung einer prämetastatischen Nische Filiae zu bilden (Abb. 17.9&10).

Die Rolle der S100-Proteine in der HPV-abhängigen und unabhängigen Karzinogenese bedarf noch weiterer Forschung, um die komplexe Rolle im Tumor und des TME in vivo zu verstehen. Ungeklärt bleibt aus den aus dieser Arbeit vorliegenden Daten und Experimenten jedoch, warum das Tumorgewebe in der 3D-Kultur nicht durchweg eine stärkere Färbung zeigt, insbesondere auch im Bereich der Lymphknotenmetastasen, die bei den TMAs durchweg S100A8/A9 kräftig in der IHC exprimieren. Möglicherweise kann das in vitro Modell, trotz der bereits elaborierten organotypischen 3D-Kultur ohne eingestreute Immunzellen und dem dadurch fehlenden Tumormikromilieu mit Chemokin/Zytokin-Regulationen keine physiologischen Bedingungen nachahmen unter denen S100 verstärkt exprimiert wird (Abb. 17). So gilt es weitere Bestrebungen anzustellen, die Regulation von Calprotectin unter dem Einfluss der viralen Onkogene bei HPV-gesteuerter Onkogenese in Zusammenspiel mit dem

TME zu verstehen, während auf der anderen Seite auch eine HPV-unabhängige Karzinogenese durch chronische Inflammation unter dem Einfluss von Calprotectin unterhalten werden kann. Mehrere lösliche Mediatoren können auch die Expression der als DAMP fungierenden Calprotectine S100A8/A9 induzieren, einschließlich LPS, TNF- α , IL-1a, IL-1b, IL-10, IL-22, VEGF-A und TGF- β mit LPS, dies könnte ein Hinweis auf eine bakterielle Beteiligung sein. So könnte S100A8/A9, aus einer Inflammation hervorgehend, über Bindung an RAGE zur Aktivierung von MAPK und NF κ B führen und hieraus folgend eine Aktivierung und Signalübertragung über STAT3-Signalwege erfolgen. Entgegengesetzt hierzu zeigten S100A8/A9 in vitro bei hohen Konzentrationen auch antitumoröse und proapoptische Eigenschaften (Ehrchen, Sunderkotter et al. 2009, Srikrishna 2012).

Neben S100 ist auch EMMPRIN (CD147) ein wichtiger Bestandteil und potenzieller diagnostischer Marker in diesem System. Die Studienlage verdichtet sich zunehmend in dem Sinne, dass dieses Glykoprotein in zahlreichen Tumorentitäten mit einer ungünstigen Prognose durch das Antreiben einer Degradation der Extrazellulärmatrix und Basalmembran über Metalloproteasen (MMP-1, -3, -9) mit invasivem Wachstum und Metastasierung assoziiert ist. Dazu kommt eine Abschirmung gegenüber wachstumshemmenden Signalen und Beeinflussung der Tumorangiogenese durch erhöhte MMP und VEGF-Expression in Tumorgewebe und dem umliegenden Mesenchym (Xin, Zeng et al. 2016). Han und Kollegen konnten dies in Ihrer Studie an über 200 Patienten mit verschiedenen urogenitalen Tumoren zeigen, dass die Patienten mit positiver Färbung eine signifikante Assoziation zu fortgeschrittenem TNM-Stadium und insgesamt reduzierter Prognose zeigten. Besonders interessant, 94,12% der Patienten mit Peniskarzinom zeigten hier eine erhöhte Expression mit signifikant besserem 5-Jahres-Überleben ohne CD147-Expression ($p=0,01$) (Han, He et al. 2010). Eine weitere Assoziation konnte zwischen CD147 und Ki-67 festgestellt werden. In einem Kollektiv von Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen zeigte sich eine Überexpression beider Marker, dies war signifikant mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem schlechten Gesamtüberleben und einem aggressiveren Tumor-Phänotyp assoziiert (Yu, Morales et al. 2015). Die Expression von membranösem CD147 (mCD147) beeinträchtigt die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und so die Effektivität von immuntherapeutischen Medikamenten (Abb. 17.5). Eine beeinträchtigte Zugänglichkeit der Tumore gegenüber der körpereigenen Immunkontrolle und medikamentösen auf T-Zellen basierenden Therapien könnte auch durch die regulatorischen Eigenschaften für Monocarboxylat-Transporter (MCT-1, -4) zu erklären sein. Um den zunehmenden Energiebedarf von Tumorzellen und tumorinfiltrierende Immunzellen zu decken, bedienen sich

diese anaerobe Glykolyse. Die so anfallende Milchsäure und deren konjugierte Base Laktat schaffen ein saures Milieu im TME, das die Proliferation von T-Zellen und die Zytokinproduktion inhibiert. Zudem kann auch eine Resistenz gegen Chemotherapeutika durch die Aktivierung von EGFR-RAS-ERK-, Phosphatidylinositol-3-Kinase- (PI3K) und des mitogen-aktivierte Proteinkinase- (MAPK) Signalweges entstehen (Krupar, Robold et al. 2014, Xin, Zeng et al. 2016, Landras, Reger de Moura et al. 2019). ADAM-Metalloproteasen spalten mCD147 zu löslichem CD147 (sCD147), das über die EMT die Invasion von Tumorzellen in neue Bereiche ermöglicht. Fibroblasten unterhalten durch eine positive Rückkopplung zudem die CD147-MMP Produktion (Abb. 17.7). Patienten mit hohen Konzentrationen von sCD147 im Serum zeigten statistisch ein schlechteres Überleben. Innerhalb von Tumoren entstehen auch Mutationen in der Ektodomäne von EMMPRIN, die die Spaltbarkeit des Glykoproteins durch ADAM12 beeinflussen. Hier kommen neben EMMPRIN also weitere Einflussfaktoren dazu, die die oben beschriebenen prognostischen Eigenschaften weiter verstärken können (Albrechtsen, Wewer Albrechtsen et al. 2019). Die Fibroblasten des TME können sich ebenso wie Immunzellen umwandeln und werden zu tumorassoziierten Fibroblasten (CAF), die durch die Produktion von MMP, die Rekrutierung weiterer MDSC und die Umwandlung myeloischer Zellen zu solchen mit einer immunsuppressiven Gensignaturen ein protumoröses Milieu unterhalten (Abb. 17.8).

Das hier beschriebene neuartige Markerprofil für das Peniskarzinom, basierend auf der vorgestellten Calprotectin-CD147-Neutrophilen Achse und den bereits erlangten Erkenntnissen aus anderen HPV-assoziierten SCC verschiedener Lokalisationen könnte in Zukunft zur weiteren molekularpathologischen Risikostratifizierung für eine ungünstige Prognose und das Auftreten von LKM in der Diagnostik beitragen. Zuvor sind jedoch weitere Erkenntnisse zur Funktion und Regulation der einzelnen Marker im komplexen Zusammenspiel des TME und spezifischer Neutrophilen-Untergruppen nötig, da die bisherigen Ergebnisse aus verschiedenen Tumorentitäten wie oben beschrieben heterogene Ergebnisse hervorbringen. Die bereits vorpublizierten Daten aus unserer Arbeitsgruppe zum Peniskarzinom, die unter anderem auch weitere Parameter wie p63 und CXLX-8 berücksichtigen, zeigen sich hierbei jedoch vielversprechend (Bernhard, Zwick et al. 2020, Mohr, Zwick et al. 2022).

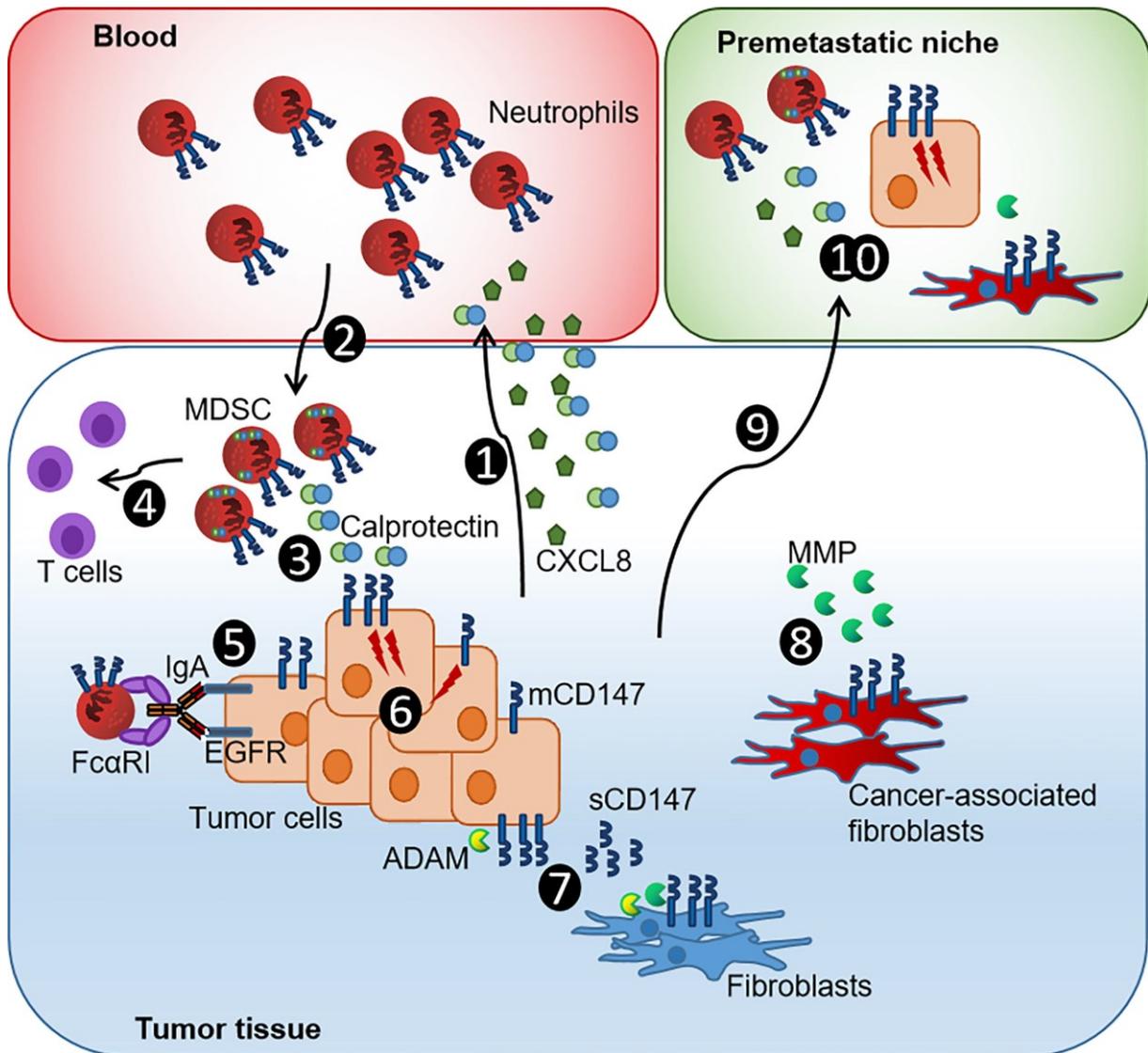


Abbildung 17 Modell der CXCL8-Calprotectin-CD147-Neutrophilen-Achse:

(1) PeCa-Zellen setzen CXCL8 und Calprotectin frei, die die Chemotaxis und die Infiltration von Neutrophilen fördern. (2) Infiltration von Calprotectin-positiven Neutrophilen, die im TME zu MDSCs umprogrammiert werden. Unterstützung des Tumorwachstums durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Matrix-Remodelling-Enzymen. (3) Autokrine Synthese von Calprotectin durch MDSCs schaffen eine positive Rückkopplungsschleife, die noch mehr MDSCs anlockt. (4) Von Neutrophilen abgeleitete MDSCs zeigen T-Zell-supprimierende Aktivität. (5) Expression von mCD147 beeinträchtigt ADCC und damit die Wirksamkeit immuntherapeutischer Ansätze. (6) Calprotectin-CD147-Achse bewirkt eine intrazelluläre Signalübertragung, die die Expression protumorigener Gene verstärkt und somit die Proliferation und Verbreitung von Krebszellen fördert. (7) ADAM-Proteasen spalten mCD147 und setzen sCD147 frei, die EMT mit Invasion und Metastasierung weiter fördern und eine positive Rückkopplungsschleife für eine anhaltende CD147-MMP-Produktion in Fibroblasten verursacht. (8) Umwandlung in tumorassoziierte Fibroblasten (CAF), die über MMP-Freisetzung und Rekrutierung weiterer MDSCs mit immunsuppressiver Gensignatur die Karzinogenese weiter fördern.

(9) TNF-a, VEGF und TGF-b induzierte Calprotectin-Synthese in distalen Organen (10) Hierdurch wird die Bildung einer Calprotectin-CD147-Neutrophilen-MDSC geprägten prämetastatischen Nischen für die Besiedlung durch Tumorzellen erleichtert. Aus der Vorpublikation (Mohr, Zwick et al. 2022).

5.6 Mögliche Angriffspunkte für zukünftige Therapien

Neben der bereits seit langem etablierten und wenig effektiven Chemotherapie mangelt es an gut untersuchten modernen Therapieoptionen wie Checkpoint-Inhibitoren und anderen zielgerichteten Therapien für Patienten mit ausgedehnten und metastasierten Peniskarzinomen. Auf Grund geringer Inzidenzen in westlichen Ländern finden sich meist nur kleine Fallserien zur Erprobung neuer oder bereits in anderen Tumoren etablierter Medikamente. Unter dem gleichen Problem leidet die Grundlagenforschung, die durch die Analyse des Genoms von Tumorzellen, der Expression potenzieller Zielstrukturen und Mutationsanalysen den Grundstein für die Anwendung bereits bekannter oder die Etablierung neuer Therapeutika schafft.

Die in der aktuellen S3-Leitlinie empfohlene Chemotherapie aus Cisplatin, Paclitaxel, Ifosfamid oder alternativ Cisplatin und 5-FU zeigen in Studien ein stark divergentes Ansprechen mit 25-100% (meist 30-38%) (AWMF 2020). Von klinischen Faktoren unabhängige Prädiktoren für das Therapieansprechen bei Platin-basierten Chemotherapie oder das Gesamtüberleben stehen aktuell nicht zur Verfügung. Necchi und Kollegen versuchten in ihrer retrospektiven Studie mit einem genomischen Profiling potenzielle Zielmoleküle zu identifizieren, waren jedoch in Ihrer Aussagekraft durch ein fehlendes präklinisches Modell limitiert (Necchi, Eigl et al. 2018). In der Zweitlinie existiert keine etablierte Standardtherapie, lediglich eine Kann-Empfehlung (Evidenzlevel 3) zur Monotherapie mit Paclitaxel. Hierbei stellt der Allgemeinzustand des Patienten und vorhandene Komorbiditäten weiter einen limitierenden Faktor bei der zu erwartenden Toxizität der Therapien dar. Patienten mit lokal fortgeschrittenen inoperablen oder metastasierten Tumoren brauchen hier besser verträgliche und wirksamere Medikamente in der Palliativtherapie zur Verzögerung oder temporären Verhinderung eines weiteren Krankheitsprogresses (AWMF 2020).

Auf Grund der limitierten Therapieoptionen und Ansprechrate bereits in der Erstlinien-Therapie für lokal weit fortgeschrittene und metastasierte Patienten ist eine weitere mechanistische Untersuchung verschiedener Signalwege und möglicher Zielmoleküle entscheidend. Als Grundlage hierfür können heute aufwendige genomische Untersuchungen zur Identifizierung und Quantifizierung vorhandener Mutationen und epigenetischer Veränderungen eingesetzt werden. Fortschritte in der NGS-Technologie ermöglichen

umfassende genomische Analysen wie in der Arbeit von McDaniel und Kollegen an verschiedenen PeCa-Primärtumoren sowie in Teilen an den dazugehörigen Metastasen gezeigt (McDaniel, Hovelson et al. 2015). Es konnten im Durchschnitt zwei relevante somatische Mutationen und eine high-level CNA als Genduplikation-/Verlust pro Probe nachgewiesen werden. Ein fortgeschrittenes Tumorstadium, fehlende p16-Expression, MYC- und CCND1-Amplifikationen waren in dem untersuchten Kollektiv aus 60 Proben signifikant mit einer kürzeren Zeit bis zur Tumorprogression und reduziertem tumorspezifischem Überleben assoziiert. Zwischen den untersuchten Primärtumoren und den dazugehörigen Metastasen zeigte sich eine intertumorale Heterogenität, insbesondere hinsichtlich der Anzahl an CNAs. Im Vergleich zu SCC anderer Lokalisationen (NSCLC, HNSCC, CeSCC) zeigten PeCa häufiger TP53 und/oder CDKN2A Alterationen (McDaniel, Hovelson et al. 2015). In einem umfassenden genomischen Tumorprofiling (CGP) haben Ali und Kollegen genomische Veränderungen (GAs) und klinisch relevante genomische Alterationen (CRGAs) untersucht (Ali, Pal et al. 2016). In 95% (19/20) der Fälle konnte eine solche Veränderung nachgewiesen werden, die häufigste GA war eine TP53-Mutation (60%) während die häufigste CRGA eine CDKN2A Punktmutation und homozygote Deletion (40%) darstellte. Daneben wurden auch Punktmutationen und Rearrangements von NOTCH1, PIK3CA-Punktmutationen und -Amplifikationen, EGFR-, RICTOR- und CCND1-Amplifikationen, BRCA2-Insertionen/Deletionen und FBXW7-Punktmutationen nachgewiesen. Davon klinisch relevant können aktuell bereits eine prätherapeutische IHC-Färbung für die EGFR-Expression (20% höhergradige Amplifikation) und eine Untersuchung auf mögliche RAS-Mutationen (10%) sein, hiermit lässt sich ein Ansprechen auf EGFR-Inhibitoren wie Cetuximab postulieren. Weitere potenzielle Angriffspunkte sind Alterationen von PIK3CA, die für ein Ansprechen auf mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus sprechen können, sowie Veränderungen von p16 durch Alterationen in CDKN2a. Hier zeigte sich in präklinischen Modellen ein erhöhtes Ansprechen bei der Behandlung mit CDK4/6-Inhibitor Palbociclib (Ali, Pal et al. 2016). Die genomischen Profile aggressiver Primärtumoren in Therapie-refraktärer und metastasierter Situation wurden von Jacob und Kollegen für penile (mPSCC) und nicht-penile kutanen SCC (mCSCC) miteinander verglichen (Jacob, Ferry et al. 2019). Dabei wurden Alterationen des mTOR-, DNA-Reparatur- (BRCA2, ACM), TKI (EGFR)-Signalwegs untersucht. Die Häufigkeit genetischer Alterationen war in beiden Tumorarten erhöht, jedoch signifikant häufiger in mCSCC. Weiter wurde die Tumormutationslast (TMB) und der Mikrosatelliten-Status verglichen, dabei zeigte sich eine signifikant höhere TMB in mCSCC mit vorheriger UV-Exposition als bei mPSCC, dazu war die Mutationslast in Metastasen höher als in den

Primärtumoren. Eine hohe Mikrosatteliteninstabilität zeigte sich jedoch in beiden Gruppen sehr selten, ebenso wie eine CD274 (PD-L1) -Amplifikation. Sie schlossen daraus, dass mCSCC von Immuntherapie und Target-Therapie profitieren, während Patienten mit mPSCC von mTOR-, PARP- und Tyrosin-Kinase-Inhibitoren mehr profitieren als von Checkpoint-Inhibitoren (Jacob, Ferry et al. 2019).

Eine Verbesserung im Ansprechen gegenüber den etablierten Zytostatika könnte über eine Überwindung von Chemoresistenzen, beispielsweise der Smad4/APC-Kodeletion bedingten Pten-Defizienz mit konsekutiv verschlechterter Wirksamkeit von Cisplatin ermöglicht werden. Hier erprobten Huang und Kollegen die Kombination von ICI (Immuncheckpoint-Inhibitoren) mit MDSC-gerichteten Medikamente (Huang, Cheng et al. 2020). Der Pten-Verlust mit Aktivierung des PI3k/akt/mTOR-Signalwegs zeigt sich hierbei unabhängig vom HPV-Status der Tumore. Genetisch modifizierten Mäusen mit Smad4/APC-Kodeletion wurden in einer zweiarmligen Studie mit IgG in der Kontrollgruppe und Anti-PD1/CTLA4 Antikörpern mit Cabozantinib (TKI) oder Celecoxib (COX2-Hemmer) in der Versuchsgruppe behandelt. Die durch Cabozantinib induzierte Blockade des PI3k-Signalwegs und die von Celecoxib ausgehende antiinflammatorische Wirkung im TME mit hochreguliertem Cox2 der murinen PeCa-Zelllinien sollen mit den ICI eine synergistische Wirkung aufzeigen. In den Versuchen zeigte sich eine marginale Reduktion des Tumorwachstums bei ICI-Therapie allein und ein synergistischer Effekt bei der Kombination mit dem TKI oder COX-Hemmer mit signifikantem Rückgang der Tumormasse. Erklärt wird dies durch die Reduktion von T_{reg}-Zellen und MDSC, während die ICI allein nur T_{reg}-Zellen reduzierten (Huang, Cheng et al. 2020). Zu ähnlichen Schlüssen kommen auch Ahmed und Kollegen in ihrer Literaturreview hinsichtlich der Synergie von ICI (PD-1/PD-L1/CTLA-4) und MDSC-inhibierenden Medikamenten (Cabozantinib/Celecoxib) bei Patienten mit zugrunde liegender Chemoresistenz (Ahmed, Falasiri et al. 2020). Solche Kombinationen könnten also unabhängig des HPV-Status in das proinflammatorische TME der Tumore eingreifen und das Ansprechen verbessern. Patienten, die in zukünftigen klinischen Screenings des TME und TMB eine Chemoresistenz aufweisen, könnten so direkt der Immuntherapie zugeführt werden (Ahmed, Falasiri et al. 2020).

Neben der genetischen und molekularbiologischen Analyse von einzelnen Zielstrukturen und deren Einfluss in verschiedenen Signalwegen, stellen auch Checkpoint-Inhibitoren in der modernen onkologischen Therapie einen wichtigen Eckpfeiler dar. Tumorzellen können sich mittels Immunevasion dem Immunsystem und den infiltrierenden zytotoxischen T-Zellen entziehen. Eine kritische Rolle dabei spielen das Transmembranprotein Programmed cell death

protein 1 (PD1) und dessen Ligand (PD-L1), sowie das Oberflächenprotein cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4). Gerade Patienten mit fortgeschrittenen und Platin-refraktären Tumoren haben nur limitierte Therapieoptionen zeigen ein schlechtes Ansprechen (OS 6-12 Monate) (Vanthoor, Vos et al. 2021). Der PD-L1-Status wurde in einer retrospektiven IHC-Studie von Ottenhof und Kollegen untersucht (Ottenhof, Djajadiningrat et al. 2017). Hier wurde die Expression mit verschiedenen cut-off-Werten von 1%, 5%, 10% und 50% sowie unterschiedliche Expressionsmuster mit dem HPV-Status und Überleben korreliert. Dabei zeigte sich bei 48% der Proben (96/200) ein positiver PD-L1-Status ($\geq 1\%$), vor allem bei Tumoren ohne Nachweis von HR-HPV-Typen. Während eine randständige Expression mit negativem Nodalstatus korrelierte, war eine diffusen Expression mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert (Ottenhof, Djajadiningrat et al. 2017). Ähnliche Ergebnisse zeigen auch kleinere Serie zur PD-L1-Expression wie von De Bacco und Kollegen, hier zeigte sich in 51,4% (18/35) der getesteten Proben eine PD-L1-Expression $\geq 1\%$. Patienten mit einem positiven Scoring zeigen eine Tendenz zur Lymphknotenmetastasierung (69%), zu Tumoren mit höherem Grading (77,8% Grad II/III) und einer p16-Assoziation ($p=0,002$) (De Bacco, Carvalhal et al. 2020). Udager und Kollegen konnten bei einem höheren cut-off-Wert von 5% sogar bei 62,2% (23/37) der Patienten eine positive PD-L1-Expression nachweisen (Udager, Liu et al. 2016). Auch hier zeigte sich eine Assoziation zu Lymphknotenmetastasen ($p=0,024$) sowie in weiterer Korrelation zu einem spezifischen histopathologischen Subtyp (gewöhnliches SCC, $p=0,040$), Auftreten von Fernmetastasen (25% vs. 0% $p=0,063$) und ein vermindertes krebsspezifisches Überleben (CSS, $p=0,011$) (Udager, Liu et al. 2016). Aktuell laufen mehrere Phasen-2-Studien mit PD-L1-ICI in Monotherapie oder Kombination zur Verbesserung des PFS und der Gesamtansprechrate (ORR), hier bleibt aktuell die Publikation der Daten noch abzuwarten (Ahmed, Falasiri et al. 2020, Tang, Hu et al. 2022).

Der EGF-Rezeptor fungiert als Transmembranprotein nach Bindung verschiedener EGF-Peptide als Rezeptor-Tyrosinkinase. Während dieser physiologisch Zellwachstum stimuliert und Apoptose verhindert, konnte in verschiedenen Tumoren eine Überexpression nachgewiesen werden. Durch Genamplifikation und Mutationen kann so über das Eingreifen in Zellwachstum, Differenzierung, Zellüberleben und Angiogenese die Tumorgenese eingeleitet und die Tumorprogression vorangetrieben werden (Normanno, De Luca et al. 2006). Eine EGFR-Überexpression konnten Gou und Kollegen in 92% (138/150) der untersuchten PeCa-Proben nachweisen. Dabei wurden Proben mit einer positiven Färbung von $\geq 51\%$ der Zellen als positiv gewertet. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zu einem erhöhten Grading, fortgeschrittenen Tumorstadium oder dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen (Gou, Li et

al. 2013). Chaux und Kollegen konnten in Ihrer Studie mit 112 PeCa Proben, möglicherweise bedingt durch die unterschiedliche methodische Auswertung, keine so ausgeprägte, jedoch trotzdem häufige, Überexpression nachweisen (Chaux, Munari et al. 2013). Aus der Vollständigkeit der Färbung im Präparat und der Intensität wurde ein Gesamtscore mit 20 Punkten gebildet. 0-3 Punkte wurden als negativ, 4-8 Punkte als geringe und 9-20 Punkte als hohe Expression gewertet. 12% (13/112) der Patienten zeigten sich negativ für eine EGFR-Expression, während weitere 44% (49/112) eine niedrige oder hohe 44% (50/112) Expression zeigten. Es konnte kein Nachweis einer statistisch signifikanten Assoziation zwischen EGFR und dem histologischen Subtyp, dem histologischen Grading oder dem HPV-Status nachgewiesen werden (Chaux, Munari et al. 2013). In der Übersichtsarbeit von Gu und Kollegen konnte hier auch anhand verschiedener bereits veröffentlichten Studien zur Anti-EGFR-Monotherapie (Cetuximab, Panitumumab, Nimotuzumab) und in Kombination mit Chemotherapeutika ein positiver Effekt dieser zielgerichteten Therapien im Rahmen einer Salvage-Therapie bei fehlendem Ansprechen auf die Primärtherapie gezeigt werden. So konnte eine verbesserte Ansprechrate und eine verlängerte Dauer bis zum Progress (TTP) gezeigt werden (Gu, Zhu et al. 2017). Während diese Medikamente bereits bei Tumorentitäten wie dem NSCLC und HNSCC in die Routine Einzug gefunden haben, bedarf es hier weiterer Studien welche Patienten hiervon primär profitieren und welche Rolle EGFR in der Tumorgenese und Progression des PeCa hat.

Necchi und Kollegen präsentierten in ihrer Single-Arm Phase 2 Studie die Ergebnisse zur Erstlinientherapie mit Dacomitinib, einem pan-HER TKI, bei 28 Patienten mit lokal fortgeschrittenen oder metastatierten Peniskarzinomen (Necchi, Lo Vullo et al. 2018). Unter der Behandlung konnte bei weitestgehend guter Verträglichkeit ein 12-Monats OS von 54,9% und ein medianes OS von 20 Monaten erreicht werden. Eine volumetrische Reduktion der Läsionen konnte bei 60,7% nachgewiesen werden, 3,6% zeigten eine CR und 28,6% eine PR. Ein stabiler Verlauf wurde bei 46,4% erreicht, während nur 21,4% unter der Behandlung eine Tumorprogression zeigten. Mutationsanalysen aus vor und nach Therapie gewonnenen Gewebeproben konnte eine TERT-Mutation bei 60% der Respondern und keine bei Non-Respondern nachweisen. Mutationen des PI3K/mTOR-Signalwegs waren dagegen ungleich verteilt mit Mutationen bei 42,9% der Responder und 8,3% der Non-Responder. In diesem Kollektiv konnte nur bei 4 Patienten, gleichsam verteilt auf Responder und Non-Responder, eine EGFR-Amplifikation nachgewiesen werden, hier gilt es weitere Untersuchungen zum Einfluss der einzelnen Mutationen und Signalwege auf die Target-Therapie anzustellen.

Elaboriertere Therapieversuche wie die Entwicklung therapeutischer Impfstoffe und spezifischer Target-Medikamente, die sich gegen HPV-Antigene richten, konnten sich bisher nicht im klinischen Alltag etablieren. Aktuell laufen mehrere Studien in denen verschiedene Typen therapeutischer Impfstoffe gegen HPV-assoziierte Präkanzerosen und Tumore gerichtet werden. Es werden lebende bakterielle und virale Vektoren, Protein-, Peptid- und Nukleinsäurebasierte sowie tumorzellbasierte Impfstoffe erprobt. Jede dieser Impfstofftypen hat unterschiedliche Vor- und Nachteile in der Handhabung, Anwendung und Immunogenität. Die Mehrheit der Impfstoffe richten sich gegen die HPV-Onkoproteine E6 und E7 über verschiedene Formen der Antigenpräsentation zur Aktivierung der zellulären Immunantwort durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Hancock, Hellner et al. 2018). Der experimentelle Impfstoff VGX-3100 auf Basis synthetischer DNA richtete sich gegen die viralen Onkogene E6/E7 und wurde bei Patientinnen mit CIN (zervikale intraepitheliale Neoplasie) erprobt. In der randomisierten, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Phase 2b-Studie von Trimble und Kollegen zeigte sich im Medikamenten-Arm ein um 19% häufigere histopathologische Regression im Vergleich zur Placebo-Gruppe, bei insgesamt guter Verträglichkeit (Trimble, Morrow et al. 2015). In einer weiteren prospektiven Phase I/IIa-Studie mit diesem Impfstoff wurden Patienten mit HNSCC in 2 Gruppen aufgeteilt und erhielten prä- und postoperativ den Impfstoff oder nach einer Radiochemotherapie mit Cisplatin. Die Patienten erhielten alle drei Wochen eine Gabe des Impfstoffes, insgesamt viermal. Tumor- und Gewebeproben wurden hinsichtlich des lymphatischen Infiltrats im Rahmen einer interventionellen Beprobung nach Vakzinapplikation evaluiert. Zusätzlich wurden Anti-HPV16/18 E6/E7 Antikörpertiter, zelluläre Antwort im IFN- γ ELISpot und die HPV-spezifische CD8⁺ T-Zell-Aktivierung mit freigesetzten Chemokinen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Der Impfstoff war auch hier gut verträglich. Bei allen Patienten zeigte sich eine positive zelluläre Immunantwort in mindestens einem Assay (Aggarwal, Cohen et al. 2015). Die Veröffentlichung der Ergebnisse weiterer laufender Studien sowie hierauf aufbauende Daten werden benötigt, um die Effektivität therapeutischer Vakzine zu verifizieren. Hierfür werden auch weitere Erkenntnisse über die immunsuppressive Wirkung des TME sowie der HPV-Pathogenese benötigt. Ebenso gilt es mögliche synergistische Effekte in der Therapie beispielsweise mit Checkpoint-Inhibitoren zu untersuchen (Yang, Farmer et al. 2016, Hancock, Hellner et al. 2018).

Wie bereits dargelegt stellt die Überexpression von CD147 in Tumorgewebe und dem umgebendem TME durch Einflussnahme auf das Wachstumsverhalten der Tumore, einer Protektion vor dem Immunsystem sowie einer gewissen Chemoresistenz einen negativen prognostischen Marker und so auch möglichen diagnostischen Biomarker dar. Anknüpfend an

die retrospektiven Daten aus diesem Patientenkollektiv mit einer erhöhten CD147-Expression im Vergleich zum Normalgewebe und einer Assoziation zu fortgeschrittenen Tumoren mit invasivem Wachstum und Lymphknotenmetastasen folgten in vitro Versuche an den bereits etablierten PeCa-Zelllinien. Die Ergebnisse dieser Untersuchung aus der Arbeitsgruppe am virologischen Institut der Universitätsklinik des Saarlandes konnten bereits vorab publiziert werden (Mohr, Zwick et al. 2022).

Organotypischen 3D-Raft-Kulturen der HPV-positiven PeCa-Zelllinie aus Primarius (P2, P3) und Lymphknotenmetastase (L2) sowie von NFK und der Vulvakarzinom-Zelllinie (A431) dienen hierbei als möglichst realitätsnahe Beschreibung der in vivo-Verhältnisse. Durch den Stimulus an der Luft-Medium-Grenze wird ein mehrschichtiges Wachstum angeregt, was eine physiologische epitheliale Differenzierung und einer interzellulären Kommunikation zwischen Tumorzellen/Keratinocyten und umliegenden Fibroblasten ermöglicht. Insbesondere für HPV-replikative Zellen hat sich dieses Verfahren bewährt, da so auch der komplette Lebenszyklus des Virus unter in vitro Bedingungen nachvollzogen werden kann (Anacker and Moody 2012).

Die IHC-Färbung von CD147 der erstellten FFPEs zeigte im Patientenkollektiv eine höhere Expression bei den HPV-positiven PeCa-Zelllinien im Vergleich zu den HPV-negativen NFK (Normalgewebe), kann hierbei jedoch nicht zwischen löslicher und membrangebundener Form unterscheiden (Abb. 18 A). Analog zu einer bereits vorpublizierten Arbeit zur PeCa-Zelllinie (Bernhard, Zwick et al. 2020) konnte hier mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) aus dem konditionierten Medium (Abb. 18 B) der PeCa-Zellkulturen ein deutlich erhöhtes sCD147 im Vergleich zu jedem der NFK festgestellt werden (P2 vs. NFK $p = 0,0210$, L3 vs. NFK $p = 0,0005$). Um auch die Expression von mCD147 zu bestimmen erfolgte im nächsten Schritt die indirekte Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (Abb. 18 C, D). Die HPV-positiven PeCa-Zelllinien exprimierten an der Zelloberfläche signifikant mehr CD147 als die HPV-negative Kontroll-Tumorzelllinie A431, insbesondere P2 und L2 (P2 vs. A431 $p = 0,0199$, L2 vs. A431 $p = 0,0002$). Die PeCa-Zelllinie L2 zeigte eine höhere Expression als die Zelllinien P2 und L3 (L3 vs. L2 $p = 0,0019$). Im nächsten Schritt wurde die Fähigkeit zur Initiation der EGFR-abhängigen ADCC (IgA2-Antikörper 224-IgA2.0) durch frisch isolierte Neutrophile bei PeCa- und A431-Tumorzellen untersucht. Die IgA-abhängige Neutrophilen vermittelte Zytotoxizität war am effektivsten bei A431 Zellen, gefolgt von P2 (A431 vs. P2 $p = 0,0223$) und L3 (A431 vs. L3 $p = 0,0065$) als Zielzellen, während L2 nicht lysiert wurde (A431 vs. L2 $p = 0,0001$). Ein signifikanter Unterschied in der Isotypen-Kontrolle konnte für A431, P2 und L3 ($p < 0,0001$) aber nicht für L2 ermittelt werden. Die spezifische

Lyserate für P2 und L3 war signifikant höher als bei L2 (P2 vs. L2 $p = 0,0047$, L3 vs. L2 $p = 0,0156$).

Die mCD147-Expression der Zellkulturen zeigt ein gegensätzliches Muster zur spezifischen Lyserate der Zellen und korreliert negativ mit der Wirksamkeit für die 225-IgA2.0 vermittelte Tumorabtötung durch Neutrophile (Abb. 18 F) in der Pearson Korrelation ($r = -0,093$, $p = 0,0454$), während sich dies für sCD147 nicht bestätigte (Pearson, $r = -0,6387$, $p = 0,3613$).

Ähnliche Ergebnisse aus der gleichen Zelllinie konnten auch Bernhard und Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe publizieren, hier führte eine Integration der viralen Onkogene in den offenen Leserahmen (OLR) zu einer erhöhten p63-Expression und im Folgenden zu einer verstärkten Freisetzung des neutrophilen-rekrutierenden Chemokins CXCL8 (Bernhard, Zwick et al. 2020). Die erhöhte CXCL8-Konzentration führt zu einer verstärkten Oberflächenexposition des Fc-Rezeptors von humanen IgA-3-Antikörpern (Fc α RI) auf Neutrophilen und korreliert mit einer höheren Empfindlichkeit gegenüber der ADCC, insbesondere P2 und L3 ($p \leq 0,0001$). Hier kann CXCL8 also nicht alleinig als negativer Einflussfaktor durch die Rekrutierung von Neutrophilen ins TME zur tumorbedingten Reprogrammierung betrachtet werden. Bereits in früheren Versuchen deutete sich so an, dass die PeCa-Zelllinie eine unterschiedliche Empfindlichkeit für die IgA-abhängige Neutrophilen vermittelte Tumorabtötung zeigt, was die Frage aufwirft, ob die mCD147 Expression einen prädiktiven Wert darstellt.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass HPV-positive Tumorzellen höhere Mengen CD147 als HPV-negative produzieren. Mehr noch suggerieren diese Resultate, dass die Empfindlichkeit der Tumorzellen mit erhöhter mCD147-Expression gegenüber Immuntherapeutika, die die Neutrophilen vermittelte ADCC aktivieren, verringert ist. So könnte CD147 zunächst als diagnostischer Biomarker bei Therapieentscheidungen helfen und im Verlauf auch als therapeutisches Target angesteuert werden. Han und Kollegen konnten in Ihrer Studie mit siRNA die CD147-Expression bei humanen Prostata-Ca- und Blasen-Ca-Zelllinien über eine Dauer von 72h mit einer Inhibierungsrate von 50% senken und anschließend eine verminderte Wachstumsrate beobachten (Han, He et al. 2010).

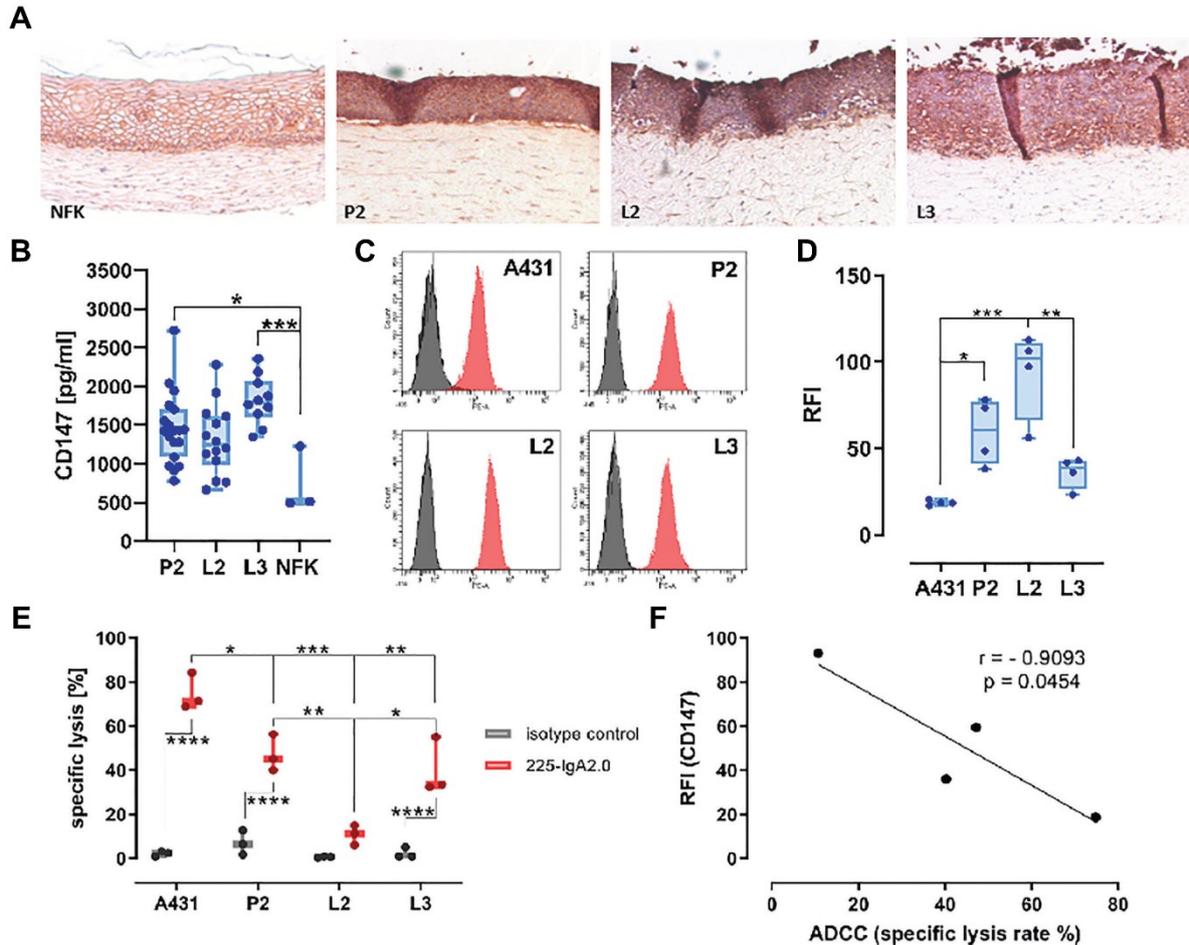


Abbildung 18 mCD147-Expression mindert die Empfänglichkeit für ADCC:

A) IHC-Färbung von CD147 von FFPE aus organotypischen 3D-Raft Kulturen der PeCa-Zelllinien P2, L2, L3 sowie NFK. Tumorzellen und Keratinozyten wurden in einer Matrix aus Rattenkollagen mit HFF eingebettetem. Verwendet wurde der anti-humane CD147-spezifischer Maus Antikörper und das Vector Goat-Anti-Rabbit-ImmPRESS DAB Kit. Gewebeaufnahmen mit Leica DMI6000 ($\times 10$ Vergrößerung).

B) Expression von sCD147 in konditionierten Zellkultur-Medien aus A) wurde mittels ELISA bestimmt.

C) Die Oberflächenexpression von mCD147 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie unter Verwendung eines anti-humanen CD147-spezifischen Maus-Antikörpers und eines PE-markierten mIgG-bindenden Proteins der PeCa-Zelllinien P2, L2, L3 und der Vulva-Ca-Zelllinie A431 untersucht. Repräsentative Darstellung der Histogramme von vier unabhängigen Experimenten.

D) Relative Fluoreszenzintensität (RFI) der vier unabhängigen Experimente in C) zusammengefasst.

E) Fähigkeit von EGFR-gerichteten IgA-Antikörpern (IgA-Isotyp-Kontrolle, 225-IgA2.0, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ADCC von Tumorzelllinien innerhalb von 3 h zu vermitteln, wurde mittels Calcein-Freisetzungssassay unter Verwendung frisch isolierter Neutrophiler (E:T-Verhältnis 40:1) getestet. A431 diente als Positivkontrolle. Calcein-beladene Zielzellen in Suspension wurden gleichzeitig für 3 Stunden mit Antikörpern und Neutrophilen behandelt und die Fluoreszenz im Überstand gemessen.

F) Pearson-Korrelation der mCD147-Oberflächenexpression auf Tumorzellen in C) und der spezifischen Lyse der

Tumorzellen in D). Die Daten werden als Box- und Whisker-Diagramm dargestellt, das alle Datenpunkte sowie Minimum und Maximum als "CD147 in [pg/ml]" in B), als "RFI" in D), als "spezifische Lyse %" als Mittelwert \pm REM in E) von drei unabhängigen Experimentläufen in dreifacher Ausführung zeigt. Signifikante Unterschiede werden durch Sternchen für $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) und $p \leq 0,0001$ (****) angezeigt, berechnet durch die einfaktorielle ANOVA, in (E) mit zweifaktorielle ANOVA mit Tukey-Mehrfachvergleichstest. Aus der Vorpublikation (Mohr, Zwick et al. 2022).

6. Literaturverzeichnis:

Aggarwal, C., et al. (2015). "Immunotherapy with VGX-3100 (HPV16 and HPV18 plasmids) + INO-9012 (DNA encoding IL-12) in human papillomavirus (HPV) associated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCCA): interim safety and immunogenicity results." Journal for ImmunoTherapy of Cancer **3**(S2).

Agrawal, A., et al. (2000). "The histological extent of the local spread of carcinoma of the penis and its therapeutic implications." BJU International **85**(3): 299-301.

Ahmed, M. E., et al. (2020). "The Immune Microenvironment in Penile Cancer and Rationale for Immunotherapy." J Clin Med **9**(10).

Aird, I., et al. (1954). "Epithelioma cuniculatum: a variety of squamous carcinoma peculiar to the foot." British Journal of Surgery **42**(173): 245-250.

Al-Ahmadie, H. (2016). "PD-L1 expression in penile cancer: a new frontier for immune checkpoint inhibitors?" Ann Oncol **27**(9): 1658-1659.

Albrechtsen, R., et al. (2019). "Identification of ADAM12 as a Novel Basigin Sheddase." Int J Mol Sci **20**(8).

Algaba, F., et al. (2005). "Intraoperative frozen section diagnosis in urological oncology." Eur Urol **47**(2): 129-136.

Ali, S. M., et al. (2016). "Comprehensive Genomic Profiling of Advanced Penile Carcinoma Suggests a High Frequency of Clinically Relevant Genomic Alterations." The Oncologist **21**(1): 33-39.

Alves, G., et al. (2001). "Genetic Imbalances in 26 Cases of Penile Squamous Cell Carcinoma." Genes, Chromosomes & Cancer **31**(1): 48-53.

Amin, A., et al. (2014). "Penile intraepithelial neoplasia with pagetoid features: report of an unusual variant mimicking Paget disease." Hum Pathol **45**(4): 889-892.

Anacker, D. and C. Moody (2012). "Generation of organotypic raft cultures from primary human keratinocytes." J Vis Exp(60).

Arbyn, M., et al. (2018). "Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors." Cochrane Database Syst Rev **5**(5): CD009069.

Argyris, P. P., et al. (2018). "Calprotectin and the Initiation and Progression of Head and Neck Cancer." J Dent Res **97**(6): 674-682.

AWMF (2020, April 2020). "S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Peniskarzinoms." 1.0. Retrieved 14.06.2021, 2021, from <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/peniskarzinom/>.

Bakardzhiev, I., et al. (2015). "Giant extragenital Bowen's disease." Wien Med Wochenschr **165**(23-24): 504-507.

Balachandran, V. P., et al. (2015). "Nomograms in oncology: more than meets the eye." Lancet Oncol **16**(4): e173-180.

Bandini, M., et al. (2020). "A risk calculator predicting recurrence in lymph node metastatic penile cancer." BJU International.

Barreto, J. E., et al. (2007). "Carcinoma Cuniculatum: A Distinctive Variant of Penile Squamous Cell Carcinoma Report of 7 Cases." The American Journal of Surgical Pathology **31**(1): 71-75.

Bernhard, M. (2019). The microenvironment of HPV-positive penile cancer and its impact on EGFR targeting immunotherapeutic approaches. Faculty of Natural Sciences and Technology III and Faculty of Medicine

Saarland University, Germany, Saarland University, Germany. Master.

Bernhard, M., et al. (2020). "The HPV and p63 status in penile cancer are linked with the infiltration and therapeutic availability of neutrophils." Molecular Cancer Therapeutics.

Bertheau, P., et al. (1998). "Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides." Journal of Clinical Pathology **51**(5): 370-374.

Biswas, C., et al. (1995). "The Human Tumor Cell-derived Collagenase Stimulatory Factor (Renamed EMMPRIN) Is a Member of the Immunoglobulin Superfamily." Cancer Research **55**: 434-439.

Bleeker, M. C., et al. (2009). "Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention." World J Urol **27**(2): 141-150.

Blows, F. M., et al. (2016). "Decline in Antigenicity of Tumor Markers by Storage Time Using Pathology Sections Cut From Tissue Microarrays." Appl Immunohistochem Mol Morphol **24**(3): 221–226.

Boldrup, L., et al. (2009). "DeltaNp63 isoforms differentially regulate gene expression in squamous cell carcinoma: identification of Cox-2 as a novel p63 target." J Pathol **218**(4): 428-436.

Brianti, P., et al. (2017). "Review of HPV-related diseases and cancers." New Microbiologica **40**(2): 80-85.

Buonerba, C., et al. (2016). "Prognostic and Predictive Factors in Patients with Advanced Penile Cancer Receiving Salvage (2nd or Later Line) Systemic Treatment: A Retrospective, Multi-Center Study." Front Pharmacol **7**: 487.

Buonerba, C., et al. (2017). "Immunotherapy for penile cancer." Future Science OA **3**(3).

Chalmers, Z. R., et al. (2017). "Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden." Genome Med **9**(1): 34.

Chamli, A. and A. Zaouak (2021). Bowenoid Papulosis. StatPearls [Internet]: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539887/>, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.

Chang, J., et al. (2014). "Diagnostic Utility of p63 Expression in the Differential Diagnosis of Pagetoid Squamous Cell Carcinoma In Situ and Extramammary Paget Disease: A Histopathologic Study of 70 Cases." The American Journal of Dermatopathology **36**(1): 49-53.

Chaux, A., et al. (2013). "The epidermal growth factor receptor is frequently overexpressed in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray and digital image analysis study of 112 cases." Hum Pathol **44**(12): 2690-2695.

Chen, H., et al. (2014). "S100 protein family in human cancer." American Journal of Cancer Research **4**(2): 89-115.

Colberg, C., et al. (2018). "[Epidemiology of penile cancer]." Urologe A **57**(4): 408-412.

Cubilla, A. L., et al. (2004). "Pseudohyperplastic Squamous Cell Carcinoma of the Penis Associated With Lichen Sclerosus. An Extremely Well-differentiated, Nonverruciform Neoplasm That Preferentially Affects the Foreskin and Is Frequently Misdiagnosed A Report of 10 Cases of a Distinctive Clinicopathologic Entity." The American Journal of Surgical Pathology **28**(7): 895-900.

Cunha, I. W., et al. (2009). "Pseudoglandular (Adenoid, Acantholytic) Penile Squamous Cell Carcinoma A Clinicopathologic and Outcome Study of 7 Patients." The American Journal of Surgical Pathology **33**(4): 551-555.

Curado, M. E., B., et al. (2007). "Cancer incidence in five continents." IARC Scientific Publications **9**(160).

Daling, J. R., et al. (2005). "Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease." Int J Cancer **116**(4): 606-616.

De Bacco, M. W., et al. (2020). "PD-L1 and p16 Expression in Penile Squamous Cell Carcinoma From an Endemic Region." Clin Genitourin Cancer **18**(3): e254-e259.

Delgado, M. A., et al. (2008). "Toll-like receptors control autophagy." The EMBO Journal **27**(7).

Di Lorenzo, G., et al. (2014). "The epidermal growth factor receptors as biological targets in penile cancer." Expert Opinion on Biological Therapy **15**(4): 473-476.

Di Lorenzo, G., et al. (2013). "Cytosolic phosphorylated EGFR is predictive of recurrence in early stage penile cancer patients: a retrospective study." Journal of Translational Medicine **11**(161).

DiVito, K. A., et al. (2004). "Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays." Lab Invest **84**(8): 1071-1078.

Dong, H., et al. (2002). "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." Nat Med **8**(8): 793-800.

Doorbar, J., et al. (2012). "The biology and life-cycle of human papillomaviruses." Vaccine **30 Suppl 5**: F55-70.

Dorofte, L., et al. (2021). "Low level of interobserver concordance in assessing histological subtype and tumor grade in patients with penile cancer may impair patient care." Virchows Arch.

Drager, D. L., et al. (2018). "[Psychosocial effects in patients with penile cancer : A systematic review]." Urologe A **57**(4): 444-452.

Ehrchen, J. M., et al. (2009). "The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer." J Leukoc Biol **86**(3): 557-566.

Erbersdobler, A. (2018). "[Pathology and histopathological evaluation of penile cancer]." Urologe A **57**(4): 391-397.

Fanning, D. M. and H. Flood (2012). "Erythroplasia of Queyrat." Clin Pract **2**(3): e63.

Feber, A., et al. (2015). "Epigenetics markers of metastasis and HPV-induced tumorigenesis in penile cancer." Clin Cancer Res **21**(5): 1196-1206.

Ficarra, V., et al. (2010). "Prognostic factors in penile cancer." Urology **76**(2 Suppl 1): S66-73.

Ficarra, V., et al. (2006). "Nomogram predictive of pathological inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis." J Urol **175**(5): 1700-1704; discussion 1704-1705.

Ficarra, V., et al. (2005). "Lymphatic and vascular embolizations are independent predictive variables of inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis: Gruppo Uro-Oncologico del Nord Est (Northeast Uro-Oncological Group) Penile Cancer data base data." Cancer **103**(12): 2507-2516.

Forse, C. L., et al. (2019). "Fresh Cut Versus Stored Cut Paraffin-Embedded Tissue: Effect on Immunohistochemical Staining for Common Breast Cancer Markers." Appl Immunohistochem Mol Morphol. **27**(3): 231–237.

Funk, S., et al. (2015). "High S100A8 and S100A12 protein expression is a favorable prognostic factor for survival of oropharyngeal squamous cell carcinoma." Int J Cancer **136**(9): 2037-2046.

Goodman, A. M., et al. (2017). "Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers." Mol Cancer Ther **16**(11): 2598-2608.

Goodman, M. T., et al. (2007). "Demographic and pathologic differences in the incidence of invasive penile cancer in the United States, 1995-2003." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(9): 1833-1839.

Gou, H. F., et al. (2013). "Epidermal growth factor receptor (EGFR)-RAS signaling pathway in penile squamous cell carcinoma." PLoS One **8**(4): e62175.

Graham, S. V. and A. A. A. Faizo (2017). "Control of human papillomavirus gene expression by alternative splicing." Virus Res **231**: 83-95.

Gravitt, P. E. and R. L. Winer (2017). "Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency." Viruses **9**(10).

Gross, G. and H. Pfister (2004). "Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts." Med Microbiol Immunol **193**(1): 35-44.

Gu, W., et al. (2017). "Beyond chemotherapy for advanced disease-the role of EGFR and PD-1 inhibitors." Transl Androl Urol **6**(5): 848-854.

Gubin, M. M., et al. (2015). "Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy." J Clin Invest **125**(9): 3413-3421.

Gumpp, V. and H. Henß (2014). Penistumor. Klinisches Krebsregister Kodierhilfe. U. F.-C. C. C. Freiburg. <https://www.uniklinik-freiburg.de/cccf/onkologisches-spitzenzentrum.html>.

Gunia, S., et al. (2013). "Inherent grading characteristics of individual pathologists contribute to clinically and prognostically relevant interobserver discordance concerning Broders' grading of penile squamous cell carcinomas." Urol Int **90**(2): 207-213.

Gunia, S., et al. (2012). "Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: p53 predicts poor prognosis." J Clin Pathol **65**(3): 232-236.

Hakenberg, O. W., et al. (2014). "Guidelines on Penile Cancer." European Association of Urology Journal Update.

Hakenberg, O. W., et al. (2018). "EAU Guidelines on Penile Cancer 2018." EAU Guidelines.

Hakenberg, O. W., et al. (2018). "The Diagnosis and Treatment of Penile Cancer." Dtsch Arztebl Int **115**(39): 646-652.

Han, Z. D., et al. (2010). "Expression and clinical significance of CD147 in genitourinary carcinomas." J Surg Res **160**(2): 260-267.

Hancock, G., et al. (2018). "Therapeutic HPV vaccines." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **47**: 59-72.

- Heidenreich, A., et al. (2008). "[Value of targeted therapy for penile cancer]." Urologe A **47**(10): 1320-1327.
- Hernandez, B. Y., et al. (2008). "Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States, 1998-2003." Cancer **113**(10 Suppl): 2883-2891.
- Hibino, T., et al. (2013). "S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis." Cancer Res **73**(1): 172-183.
- Hinten, F., et al. (2018). "Vulvar cancer: Two pathways with different localization and prognosis." Gynecol Oncol **149**(2): 310-317.
- Hölters, S., et al. (2019). "Challenging the prognostic impact of the new WHO and TNM classifications with special emphasis on HPV status in penile carcinoma." Virchows Arch **475**(2): 211-221.
- Hoos, A. and C. Cordon-Cardo (2001). "Tissue Microarray Profiling of Cancer Specimens and Cell Lines: Opportunities and Limitations." Laboratory Investigation **Vol. 81**(No. 10): 1331-1338.
- Horenblas, S., et al. (2008). Urological Oncology, Springer-Verlag London.
- Huang, M., et al. (2019). "S100A9 Regulates MDSCs-Mediated Immune Suppression via the RAGE and TLR4 Signaling Pathways in Colorectal Carcinoma." Front Immunol **10**: 2243.
- Huang, T., et al. (2020). "Effective combinatorial immunotherapy for penile squamous cell carcinoma." Nat Commun **11**(1): 2124.
- Iacono, K. T., et al. (2007). "CD147 Immunoglobulin Superfamily Receptor Function and Role in Pathology." Experimental and Molecular Pathology **83**(3): 283–295.
- Iafrate, M., et al. (2020). "Efficacy of topical photodynamic therapy in the treatment of Erythroplasia of Queyrat." Dermatol Reports **12**(1): 8566.
- Igakura, T., et al. (1998). "A Null Mutation in Basigin, an Immunoglobulin Superfamily Member, Indicates Its Important Roles in Peri-implantation Development and Spermatogenesis." Development Biology **194**: 152-165.
- Jacob, J. M., et al. (2019). "Comparative Genomic Profiling of Refractory and Metastatic Penile and Nonpenile Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Implications for Selection of Systemic Therapy." The Journal of Urology **201**(3): 541-548.
- Jacobs, T. W., et al. (1996). "Loss of Tumor Marker-Immunostaining Intensity on Stored Paraffin Slides of Breast Cancer." Journal of the National Cancer Institute **Vol. 88**(No. 15): 1054-1159.
- Kakies, C., et al. (2014). "Reproducibility of histopathologic tumor grading in penile cancer—results of a European project." Virchows Archiv: European Journal of Pathology.

Kanekura, T., et al. (1991). "Basigin, a new member of the immunoglobulin superfamily: genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences." Cell Structure and Function **16**(1): 23-30.

Khammanivong, A., et al. (2016). "Involvement of calprotectin (S100A8/A9) in molecular pathways associated with HNSCC." Oncotarget **7**(12): 14029-14047.

Kim, M., et al. (2019). "Effect of S100A8 and S100A9 on expressions of cytokine and skin barrier protein in human keratinocytes." Molecular Medicine Reports.

Kirtschig, G. (2016). "Lichen Sclerosus-Presentation, Diagnosis and Management." Dtsch Arztebl Int **113**(19): 337-343.

Kirtschig, G., et al. (2015). "Evidence-based (S3) Guideline on (anogenital) Lichen sclerosus." J Eur Acad Dermatol Venereol **29**(10): e1-43.

Kommu, S., et al. (2004). "SQUAMOUS CELL CARCINOMA ANTIGEN AS A BIOMARKER FOR PENILE CANCER." BJU Int **95**(4): 478-479.

Kononen, J., et al. (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nature medicine **4**(7): 844-847.

Krupar, R., et al. (2014). "Immunologic and metabolic characteristics of HPV-negative and HPV-positive head and neck squamous cell carcinomas are strikingly different." Virchows Arch **465**(3): 299-312.

Landras, A., et al. (2019). "CD147 Is a Promising Target of Tumor Progression and a Prognostic Biomarker." Cancers (Basel) **11**(11).

Leong, A. S.-Y. (2004). "Pitfalls in Diagnostic Immunohistology." Adv Anat Pathol **11**(2): 86-93.

Li, H., et al. (2017). "Immunohistochemistry Microarrays." Analytical Chemistry **89**(17): 8620-8625.

Li, R., et al. (2001). "Basigin (Murine EMMPRIN) Stimulates Matrix Metalloproteinase Production by Fibroblasts." Journal Cellular Physiology **186**: 371-379.

Li, Z. S., et al. (2016). "Clinical significance of preoperative C-reactive protein and squamous cell carcinoma antigen levels in patients with penile squamous cell carcinoma." BJU Int **118**(2): 272-278.

Lont, A. P., et al. (2006). "Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival." Int J Cancer **119**(5): 1078-1081.

Lopes, A., et al. (2002). "p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy." The Journal of Urology **168**(1): 81-86.

- Maden, C., et al. (1993). "History of Circumcision, Medical Conditions, and Sexual Activity and Risk of Penile Cancer." Journal of the National Cancer Institute **85**(1): 19-24.
- Madsen, B., et al. (2008). "Risk Factors for Squamous Cell Carcinoma of the Penis - Population-Based Case-Control Study in Denmark." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(10): 2683-2691.
- Mangino, G., et al. (2016). "Inflammatory microenvironment and human papillomavirus-induced carcinogenesis." Cytokine Growth Factor Rev **30**: 103-111.
- Marthaler, A. M., et al. (2017). "Identification of C/EBP α as a novel target of the HPV8 E6 protein regulating miR-203 in human keratinocytes." PLOS Pathogens **13**(6): e1006406.
- Martins, V., et al. (2020). "Presence of HPV with overexpression of p16INK4a protein and EBV infection in penile cancer-A series of cases from Brazil Amazon." PLoS One **15**(5): e0232474.
- Masferrer, E., et al. (2012). "MYC copy number gains are associated with poor outcome in penile squamous cell carcinoma." J Urol **188**(5): 1965-1971.
- May, M., et al. (2018). "[Molecular characterization of penile cancer : Literature review of new prognostic markers and potential therapeutic targets]." Urologe A **57**(4): 398-407.
- McDaniel, A. S., et al. (2015). "Genomic Profiling of Penile Squamous Cell Carcinoma Reveals New Opportunities for Targeted Therapy." Cancer Res **75**(24): 5219-5227.
- Minhas, S., et al. (2010). "Penile cancer--prevention and premalignant conditions." Urology **76**(2 Suppl 1): S24-35.
- Miralles-Guri, C., et al. (2009). "Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma." J Clin Pathol **62**(10): 870-878.
- Miyauchi, T., et al. (1990). "Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen." Journal of biochemistry **107**(2): 316-323.
- Mohr, T., et al. (2022). "The prominent role of the S100A8/S100A9-CD147 axis in the progression of penile cancer." Front Oncol **12**: 891511.
- Moore, B. W. (1965). "A soluble protein characteristic of the nervous system." Biochemical and Biophysical Research Communications **19**(6): 739-744.
- Morgan, I. M., et al. (2017). "Integration of Human Papillomavirus Genomes in Head and Neck Cancer: Is It Time to Consider a Paradigm Shift?" Viruses **9**(8).
- Nabeshima, K., et al. (2006). "Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression." Pathol Int **56**(7): 359-367.

Naumann, C. M., et al. (2012). "Establishment and characterization of primary cell lines of squamous cell carcinoma of the penis and its metastasis." J Urol **187**(6): 2236-2242.

Necchi, A., et al. (2018). "Gene Expression Profiling of Advanced Penile Squamous Cell Carcinoma Receiving Cisplatin-based Chemotherapy Improves Prognostication and Identifies Potential Therapeutic Targets." Eur Urol Focus **4**(5): 733-736.

Necchi, A., et al. (2018). "First-line therapy with dacomitinib, an orally available pan-HER tyrosine kinase inhibitor, for locally advanced or metastatic penile squamous cell carcinoma: results of an open-label, single-arm, single-centre, phase 2 study." BJU International **121**(3): 348-356.

Nielsen, J. D., et al. (2000). "The effect of low-dose acetylsalicylic acid on bleeding after transurethral prostatectomy--a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study." Scand J Urol Nephrol **34**(3): 194-198.

Normanno, N., et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer." Gene **366**(1): 2-16.

O'Rourke, M. A., et al. (2012). "Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis." Oral Oncol **48**(12): 1191-1201.

Olesen, T. B., et al. (2019). "Prevalence of human papillomavirus DNA and p16INK4a in penile cancer and penile intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis." The Lancet Oncology **20**(1): 145-158.

Onywera, H., et al. (2020). "The Penile Microbiota in Uncircumcised and Circumcised Men: Relationships With HIV and Human Papillomavirus Infections and Cervicovaginal Microbiota." Front Med (Lausanne) **7**: 383.

Ottenhof, S. R., et al. (2017). "Expression of Programmed Death Ligand 1 in Penile Cancer is of Prognostic Value and Associated with HPV Status." J Urol **197**(3 Pt 1): 690-697.

Ottenhof, S. R., et al. (2018). "The Prognostic Value of Immune Factors in the Tumor Microenvironment of Penile Squamous Cell Carcinoma." Front Immunol **9**: 1253.

Paiva, G. R., et al. (2015). "Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis." Int Urol Nephrol **47**(2): 295-299.

Parkin, D. M. and F. Bray (2006). "Chapter 2: The burden of HPV-related cancers." Vaccine **24 Suppl 3**: S3/11-25.

Parrish, J. A., et al. (1974). "Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light." NEJM **291**(23).

Pereira-Lourenco, M., et al. (2020). "Prognostic value of p16INK4a overexpression in penile cancer." Arch Ital Urol Androl **92**(1): 11-16.

Podgorska, M. (2017). Regulation and impact of Ca²⁺-binding S100A8 and S100A9 proteins during HPV-induced carcinogenesis Virologie, Universität des Saarlandes.

Podgorska, M., et al. (2018). "Chronic Inflammatory Microenvironment in Epidermodysplasia Verruciformis Skin Lesions: Role of the Synergism Between HPV8 E2 and C/EBPbeta to Induce Pro-Inflammatory S100A8/A9 Proteins." Front Microbiol **9**: 392.

Pow-Sang, M. R., et al. (2010). "Epidemiology and natural history of penile cancer." Urology **76**(2 Suppl 1): S2-6.

Protzel, C., et al. (2007). "Expression of proliferation marker Ki67 correlates to occurrence of metastasis and prognosis, histological subtypes and HPV DNA detection in penile carcinomas." Histol Histopathol **22**(11): 1197-1204.

Qu, X. M., et al. (2018). "Validation of predictors for lymph node status in penile cancer: Results from a population-based cohort." Can Urol Assoc J **12**(4): 119-125.

Robert Koch-Institut, Z. f. K. (2024, 13.09.2022). "Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten." Retrieved 04.02.2024, 2024, from www.krebsdaten.de/abfrage.

Rubin, M. A., et al. (2001). "Detection and Typing of Human Papillomavirus DNA in Penile Carcinoma." American Journal of Pathology **159**(4): 1211-1218.

Ryckman, C., et al. (2003). "Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion." J Immunol **170**(6): 3233-3242.

Sanchez, D. F., et al. (2015). "Pathological factors, behavior, and histological prognostic risk groups in subtypes of penile squamous cell carcinomas (SCC)." Semin Diagn Pathol **32**(3): 222-231.

Sand, F. L., et al. (2018). "Prognostic Significance of HPV and p16 Status in Men Diagnosed with Penile Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **27**(10): 1123-1132.

Schlenker, B. and P. Schneede (2019). "The Role of Human Papilloma Virus in Penile Cancer Prevention and New Therapeutic Agents." Eur Urol Focus **5**(1): 42-45.

Schneede, P. and B. Schlenker (2018). "[Anogenital warts and HPV-associated precancers : Looking into the recently passed German S2k guideline]." Urologe A **57**(4): 453-457.

Schneede, P. and B. Schlenker (2018). "[Human papillomavirus and penile cancer : Thinking about measures for prevention]." Urologe A **57**(4): 413-417.

Schoeneich, G., et al. (1999). "Peniskarzinom." Journal für Urologie und Urogynäkologie **6**(1): 16-27.

- Senba, M., et al. (2006). "The prevalence of human papillomavirus genotypes in penile cancers from northern Thailand." J Med Virol **78**(10): 1341-1346.
- Si, Y., et al. (2019). "Multidimensional imaging provides evidence for down-regulation of T cell effector function by MDSC in human cancer tissue." Science Immunology **4**(11).
- Sievert, K. D., et al. (2018). "[Penile cancer: diagnosis and staging]." Urologe A **57**(4): 418-422.
- Sinha, P., et al. (2008). "Proinflammatory S100 Proteins Regulate the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells." Journal of Immunology **181**(7): 4666–4675.
- Smola, S. (2017). "Immunopathogenesis of HPV-Associated Cancers and Prospects for Immunotherapy." Viruses **9**(9).
- Sohn, M., et al. (2018). "[Reconstructive surgery in penile cancer]." Urologe A **57**(4): 428-434.
- Sporkert, M. and A. Rubben (2017). "Buschke-Löwenstein-Tumor." Hautarzt **68**(3): 199-203.
- Srikrishna, G. (2012). "S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy." J Innate Immun **4**(1): 31-40.
- St. Claire, K., et al. (2019). "Extramammary Paget disease." Dermatology Online Journal **25**(4).
- Steinestel, J., et al. (2015). "The role of histologic subtype, p16(INK4a) expression, and presence of human papillomavirus DNA in penile squamous cell carcinoma." BMC Cancer **15**: 220.
- Stern, R. S. (2012). "The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: a 30-year prospective study." J Am Acad Dermatol **66**(4): 553-562.
- Strasser, B., et al. (2014). "Evolutionary origin and diversification of epidermal barrier proteins in amniotes." Mol Biol Evol **31**(12): 3194-3205.
- Strickley, J. D., et al. (2019). "Immunity to commensal papillomaviruses protects against skin cancer." Nature **575**(7783): 519-522.
- Su, X., et al. (2020). "Recurrent Metastatic Penile Cancer Patient with Positive PD-L1 Expression Obtained Significant Benefit from Immunotherapy: A Case Report and Literature Review." Onco Targets Ther **13**: 3319-3324.
- Szymonowicz, K. A. and J. Chen (2020). "Biological and clinical aspects of HPV-related cancers." Cancer Biol Med **17**(4): 864-878.
- Tang, Y., et al. (2022). "Immune landscape and immunotherapy for penile cancer." Front Immunol **13**: 1055235.

Tang, Y., et al. (2004). "Tumor-Stroma Interaction: Positive Feedback Regulation of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) Expression and Matrix Metalloproteinase-Dependent Generation of Soluble EMMPRIN." Molecular Cancer Research **2**: 73-80.

Touloupidis, S., et al. (2007). "Clinical usage of the squamous cell carcinoma antigen in patients with penile cancer." Int J Urol **14**(2): 174-176.

Trimble, C. L., et al. (2015). "Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial." The Lancet **386**(10008): 2078-2088.

Trottier, H., et al. (2016). "Human papillomavirus (HPV) perinatal transmission and risk of HPV persistence among children: Design, methods and preliminary results of the HERITAGE study." Papillomavirus Res **2**: 145-152.

Tseng, H. F., et al. (2001). "Risk factors for penile cancer: results of a population-based case-control study in Los Angeles County (United States)." Cancer Causes & Control **12**: 267-277.

Udager, A. M., et al. (2016). "Frequent PD-L1 expression in primary and metastatic penile squamous cell carcinoma: potential opportunities for immunotherapeutic approaches." Ann Oncol **27**(9): 1706-1712.

Van Howe, R. S. and F. M. Hodges (2006). "The carcinogenicity of smegma: debunking a myth." J Eur Acad Dermatol Venereol **20**(9): 1046-1054.

Vanthoor, J., et al. (2021). "Penile cancer: potential target for immunotherapy?" World Journal of Urology **39**(5): 1405-1411.

Velazquez, E. F., et al. (2008). "Histologic Grade and Perineural Invasion are More Important Than Tumor Thickness as Predictor of Nodal Metastasis in Penile Squamous Cell Carcinoma Invading 5 to 10mm." The American Journal of Surgical Pathology **32**(7): 974-979.

Velazquez, E. F. and A. L. Cubilla (2003). "Lichen Sclerosus in 68 Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Penis." American Journal of Surgical Pathology **27**: 1448-1453.

Velazquez, E. F., et al. (2005). "Sarcomatoid Carcinoma of the Penis A Clinicopathologic Study of 15 Cases." The American Journal of Surgical Pathology **29**(9): 1152-1158.

Wang, J. C. K., et al. (2024). "Structure of the p53 degradation complex from HPV16." Nat Commun **15**(1): 1842.

Wang, S., et al. (2018). "S100A8/A9 in inflammation." Frontiers in Immunology **9**(1296).

Wang, X. and M. Wang (2010). "The S100 protein family and its application in cardiac diseases." World Journal of Emergency Medicine **1**(3): 165-168.

Westrich, J. A., et al. (2017). "Evasion of host immune defenses by human papillomavirus." Virus Res **231**: 21-33.

Woodman, C. B., et al. (2007). "The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues." Nat Rev Cancer **7**(1): 11-22.

Xin, X., et al. (2016). "CD147/EMMPRIN overexpression and prognosis in cancer: A systematic review and meta-analysis." Scientific Reports **6**: 32804.

Xu, J., et al. (2013). "A novel role of EMMPRIN/CD147 in transformation of quiescent fibroblasts to cancer-associated fibroblasts by breast cancer cells." Cancer Letters **335**(2): 380-386.

Xu, J., et al. (2007). "HAb18G/CD147 functions in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma." Mol Cancer Res **5**(6): 605-614.

Yang, A., et al. (2016). "Perspectives for therapeutic HPV vaccine development." J Biomed Sci **23**(1): 75.

Yang, J., et al. (2018). "Calcium-Binding Proteins S100A8 and S100A9: Investigation of Their Immune Regulatory Effect in Myeloid Cells." Int J Mol Sci **19**(7).

Yu, Y.-H., et al. (2015). "CD147 and Ki-67 overexpression confers poor prognosis in squamous cell carcinoma of oral tongue: A tissue microarray study." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology **119**(5): 553–565.

Zhang, J., et al. (2018). "Prognostic Significance of P16(INK4a) Expression in Penile Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis with Trial Sequential Analysis." Biomed Res Int **2018**: 8345893.

Zhang, S., et al. (2017). "Distinct prognostic values of S100 mRNA expression in breast cancer." Sci Rep **7**: 39786.

Zhao, F., et al. (2012). "S100A9 a new marker for monocytic human myeloid-derived suppressor cells." Immunology **136**(2): 176-183.

Zhu, X., et al. (2013). "Immunohistochemical expression of RAGE and its ligand (S100A9) in cervical lesions." Cell Biochem Biophys **66**(3): 843-850.

Zhu, X., et al. (2009). "Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer." Gynecol Oncol **112**(1): 248-256.

Zhu, Y., et al. (2008). "The value of squamous cell carcinoma antigen in the prognostic evaluation, treatment monitoring and followup of patients with penile cancer." J Urol **180**(5): 2019-2023.

Zhu, Y., et al. (2010). "Development and evaluation of a nomogram to predict inguinal lymph node metastasis in patients with penile cancer and clinically negative lymph nodes." J Urol **184**(2): 539-545.

Zhu, Y., et al. (2007). "The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile squamous cell carcinoma treated with surgery." BJU Int **100**(1): 204-208.

zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer **2**(5): 342-350.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Sigrun Smola als Chefin des Instituts für Virologie und Doktormutter bedanken, die mich neben dieser Doktorarbeit auch initial zur Aufnahme des Medizinstudiums ermutigt hat. In besonderem Maße möchte ich mich bei meinem Betreuer Herr PD Dr. rer. nat. Stefan Lohse bedanken, der mich über die Dauer meiner Promotion betreut hat und mir die Möglichkeit gab meine Arbeit bereits vorab in Form von Publikationen und als Postervortrag auf einem Kongress vorzustellen.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Junker als Leiterin der klinisch-experimentellen Forschung der Urologie für die gute Kooperation zwischen den Fachabteilungen und dem produktiven Austausch von Ideen im Entstehungsprozess bedanken.

Bei der Leiterin des Instituts für Anatomie Frau Prof. Dr. med. vet. Gabriela Krasteva-Christ und Herr Dr. rer. physiol. Christian Herr aus der Experimentellen Pulmologie möchte ich mich für die Nutzung der Gerätschaften und Räumlichkeiten bedanken.

Gleichermaßen möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich verständnisvoll und immerzu ermunternd während des Arbeitsprozesses begleitet haben.

8. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht

